

# NMR-basierte Aufklärung der Strukturen von Ras-Bindedomänen und ihrer Wechselwirkungen mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät III  
- Biologie und Vorklinische Medizin -  
der Universität Regensburg

durchgeführt am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie  
der Universität Regensburg  
unter Anleitung von  
Prof. Dr. Dr. Kalbitzer



vorgelegt von

Ralph-Peter Elsner

aus Regensburg

November 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>2. GRUNDLAGEN</b>	<b>8</b>
2.1. Onkogene der Signaltransduktion	8
2.2. GTP-bindende Proteine	9
2.3. Die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine	10
2.4. Das Ras-Protein	11
2.5. Das Ras-verwandte Protein Rap1A	12
2.6. Biologische Funktion von AF6	13
2.6.1. Die Ras-Bindedomäne von AF6	17
2.7. Biologische Funktion des Ras-Effektors Byr2	18
2.7.1. Die bisherige Strukturvorstellung von Byr2-RBD	19
2.8. Der Ras-Effektor Nore1	21
2.8.1. Domänenstruktur von Nore1	23
2.9. NMR-Spektroskopie	24
2.9.1. Physikalische Grundlagen	24
2.9.2. Methodische Entwicklung in der NMR	30
<b>3. METHODEN UND EXPERIMENTE</b>	<b>34</b>
3.1. Strukturaufklärung von AF6-RBD und Byr2-RBD	34
3.1.1. Distanzbeschränkungen	34
3.1.2. Dipolare Kopplungen	35
3.1.3. Einschränkungen für Diederwinkel	35
3.1.4. Strukturrechnung mit CNS	36
3.1.5. Strukturverfeinerung im Lösungsmittel Wasser	39
3.1.6. Beurteilung von Strukturen	40
3.2. Modelle der Komplexstrukturen	42
3.2.1. Bestimmung der AF6-Bindungsfläche für Rap1A und H-Ras	42
3.2.2. Strukturmodell von H-Ras	43
3.2.3. Strukturmodell von Rap1A	44
3.2.4. Docking von AF6 mit H-Ras und Rap1A	44
3.3. Sequentielle Zuordnung von Nore1-RBD	47
3.3.1. Proteinexpression und Isotopenmarkierung	47
3.3.2. Probenzusammensetzung und Spektrenaufnahme	48
3.3.3. NMR-Experimente zur Zuordnung der Resonanzen	49

---

<b>4. NMR-STRUKTUR DER RBD VON AF6</b>	<b>52</b>
4.1. Sekundärstruktur von AF6-RBD	52
4.1.1. Sekundärstrukturvorhersage durch chemische Verschiebung	52
4.1.2. Sekundärstrukturbestimmung durch NOE-Kontakte	53
4.2. Restraints für die Strukturrechnung	55
4.2.1. NOE-Kontakte	55
4.2.2. Wasserstoffbrücken	56
4.2.3. Diederwinkel	57
4.3. Tertiärstruktur der AF6-RBD	57
4.4. Interaktion von AF6 mit H-Ras und Rap1A	66
4.4.1. Docking von AF6 an H-Ras	66
4.4.2. Docking von AF6 an Rap1A	78
4.5. Interaktion von AF6 unter gleichen Bedingungen für H-Ras und Rap1A	90
4.5.1. Dockingprotokoll und Resultate für den Komplex AF6•H-Ras	91
4.5.2. Dockingprotokoll und Resultate für den Komplex AF6•Rap1A	100
<b>5. STRUKTURVERFEINERUNG DER RBD VON BYR2</b>	<b>108</b>
5.1. NMR-Struktur der Byr2-RBD vor der Strukturverfeinerung	108
5.2. Ergebnis der Strukturverfeinerung von Byr2-RBD	109
<b>6. STRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN AN NORE1-RBD</b>	<b>117</b>
6.1. Arbeiten zur sequentiellen Zuordnung von Nore1-RBD	117
<b>7. DISKUSSION</b>	<b>121</b>
7.1. Struktur von AF6-RBD	121
7.2. Interaktion von AF6-RBD und H-Ras (s. 4.4.1)	124
7.3. Interaktion von AF6-RBD und Rap1A (s. 4.4.2)	128
7.4. Modellierung der Interaktion von AF6-RBD unter gleichen Bedingungen für die beiden Ras-Moleküle H-Ras und Rap1A	130
7.5. Strukturverfeinerung von Byr2-RBD	135
7.6. Die sequentielle Zuordnung von Nore1-RBD	137
<b>8. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>139</b>
<b>9. LITERATUR</b>	<b>141</b>

---

Promotionsgesuch eingereicht am 21.11.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Dr. Kalbitzer

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Sterner
1. Gutachter:	Prof. Dr. Dr. Kalbitzer
2. Gutachter:	PD Dr. Rachel
Drittprüfer:	Prof. Dr. Brunner



Du fragst  
mich,  
was soll  
ich tun?  
Und  
ich sage:  
Lebe wild  
und  
gefaehrlich,  
Artur.

1

---

<sup>1</sup> [mit freundlicher Genehmigung von © Kulturrecycling]

# 1. Einleitung

Krebs ist eine Erkrankung, deren Ursprung in einer Störung der Kommunikation zwischen Zellen liegt. Diese Definition impliziert, dass diese Erkrankung nur in einem komplexen Organismus auftreten kann, dessen Funktionsfähigkeit von einer reibungslosen Interaktion zwischen seinen Einzelzellen abhängt. Im Laufe ihrer Entwicklung differenzieren sich diese Zellen zu verschiedenen Geweben aus, die jeweils eine spezielle lebenserhaltende Aufgabe erfüllen. Wie jeder Produktionsprozess ist auch die Neubildung von Körpergeweben fehleranfällig, Fehlregulationen des Zellwachstums können zu einer unkontrollierten Gewebevermehrung im Körper führen, die wir als „Tumor“ bezeichnen. Tumore sind nicht per se gefährlich, eine Bedrohung für die Funktionsfähigkeit des Organismus entsteht erst dann, wenn sie entarten und es somit zu einer nachhaltigen Störung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen Zellzyklus, also Wachstum und Teilung, und kontrolliertem Zelltod, der Apoptose, kommt. Man kann die Ursache dieser fehlgesteuerten Entwicklung letztlich auf eine einzelne Zelle zurückführen, deren Signal zur Zellteilung sich nicht mehr abschalten lässt und die diese Eigenschaft auf ihre Tochterzellen weitervererbt. Da das Signal zur Initialisierung des Zellzyklus die Zellen von außen erreicht, handelt es sich also letztlich um einen Fehler in der intrazellulären Verarbeitung eines externen Signals.

Dabei bindet ein extrazelluläres Signalmolekül entweder an einen membranständigen Rezeptor einer Zelle, der das Signal weiter ins Zellinnere vermittelt, oder es diffundiert direkt durch die Plasmamembran, um eine zelluläre Reaktion auszulösen. Die verschiedensten Organismen bedienen sich bei der Informationsübertragung, der sogenannten Signaltransduktion, Signalwege, die sich trotz zum Teil unterschiedlichster Aufgaben sehr ähnlich sind. Ein in der Biologie häufig beschriebenes Prinzip der intrazellulären Signalweiterleitung ist die Signalübertragung durch sogenannte G-Proteine. Neben den trimeren G-Proteinen spielen hier die kleinen GTPasen eine zentrale Rolle, die über ein gebundenes Guaninnukleotid in der Lage sind, als molekulare Schalter zu wirken. In ihrem aktivierten, GTP-gebundenen Zustand können diese Proteine mit den Bindungsdomänen eines Effektormoleküls in Wechselwirkung treten. Die strukturellen Unterschiede solcher Effektormoleküle bestimmen so den weiteren Verlauf des Signals in der Signalkaskade. Eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, die auf dem Prinzip der Bindung von GTP (aktiver Zustand) oder GNP (inaktiv) beruhen, werden von den sogenannten Ras-Proteinen reguliert. Eine dauerhafte Aktivierung des Ras-Proteins aufgrund einer mutationsbedingten Fehlfunktion kann zu Störungen in der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und der Apoptose führen. Aktiviertes Ras bindet an bestimmte Regionen eines Ras-spezifischen Effektorproteins, der sogenannten Ras-Bindedomäne. Die gebundenen Effektoren erfahren durch die Bindung an Ras eine Konformationsänderung, die entweder die an sie gebundenen Proteine aktiviert oder deren Wechselwirkung mit anderen Molekülen fördert oder hemmt. Die kleine GTPase Ras erschließt durch die Fähigkeit, verschiedene Effektoren zu binden, ein Netzwerk

verschiedener Signalwege. Mutationen des Ras-Gens (z. B. im Codon 12, 13 oder 61) [Bos89] führen zu einem nicht

hydrolysierbaren stets aktiven Ras-Protein, welches im Organismus molekulare Erkrankungen wie z. B. Neurofibromatose [Wei99] oder Tumorwachstum auslöst [Bar87]. Ließe sich die Ras-vermittelte Signaltransduktion durch Inhibitormoleküle, die sich zwischen die Interaktionsstellen von Ras und Effektor drängen, unterbinden, könnten Erkrankungen, die auf einer fehlerhaften Signalweiterleitung durch Ras oder einen seiner Effektoren beruhen, gelindert oder gar therapiert werden. Der Entwurf eines künstlich hergestellten Inhibitormoleküls, bei dem es sich z. B. um ein Peptid handeln könnte, setzt die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur sowohl von Ras als auch die der Ras-Bindedomänen seiner Effektoren in einer möglichst natürlichen Umgebung voraus. Bindungs- und Moleküldynamikstudien geben detaillierte Hinweise über die Wechselwirkungen, die den Ras•Effektor-Komplex stabilisieren.

Mit der hochauflösenden Flüssigkeitskernspinresonanz – Spektroskopie (NMR) existiert eine Methode, die dreidimensionale Struktur eines Makromoleküls unter nahezu physiologischen Bedingungen in atomarer Auflösung aufzuklären und zu untersuchen. Kennt man die Zuordnung der Resonanzfrequenzen zu den einzelnen Aminosäureresten in der Proteinsequenz einer dreidimensionalen NMR-Struktur, lassen sich durch NMR-spezifische Bindungsstudien Aussagen darüber machen, welche Atome des Moleküls an der Wechselwirkung mit einem anderen Molekül beteiligt sind. Durch die beständige Verbesserung der NMR-Methoden und der Leistungsfähigkeit der Spektrometer war auch der Anreiz geschaffen, innovative Computerprogramme zur Spektrenauswertung und zur Berechnung und Analyse von Komplexstrukturen zu entwickeln. Moleküldynamikprogramme erlauben es, unter Verwendung experimentell gewonnener Daten ganze Komplexstrukturen zweier interagierender Moleküle zu berechnen, deren dreidimensionale Struktur hinsichtlich der für die Stabilität des Komplexes verantwortlichen Wechselwirkungen analysiert werden kann.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden NMR-Methoden eingesetzt, um verschiedenartige strukturelle Untersuchungen an Effektoren und Proteinen der Ras-Familie durchzuführen. Damit wurde die Grundlage für weitere Moleküldynamiksimulationen zur Berechnung der Wechselwirkungen eines Effektors von Ras-Molekülen mit seinen GTPasen in einem Molekülkomplex geschaffen.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Ras-Bindedomäne des Effektors AF6, der mit den beiden kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A in einem Molekülkomplex wechselwirkt. Ausgehend von der Struktur der 16,5 kDa schweren Proteindomäne aus rnAF6 (1-141) sollte untersucht werden, welche Aminosäuren von AF6-RBD mit den beiden GTPasen H-Ras und Rap1A in Wechselwirkung treten. Dabei sollte ein spezielles Computerprogramm zur Simulation von Molekülkomplexen Verwendung finden. Weitere strukturelle Untersuchungen sollten zu Verfeinerung der NMR-Struktur der Proteinkinase Byr2 beitragen.

## 2. Grundlagen

### 2.1. Onkogene der Signaltransduktion

Der menschliche Körper besteht aus 10 Billionen Zellen. Jede einzelne Zelle muss ständig auf äußere Signale und auf Signale anderer Zellen reagieren, um die Funktion des Körpers als Einheit zu gewährleisten. Voraussetzungen dafür sind Erkennung, Verarbeitung und Weiterleitung des Signals über intrazelluläre Signalwege. Diese Signalwege regulieren in jeder Zelle zum Beispiel den Stoffwechsel, das Wachstum und die Teilung. Wenn es zu Störungen und Fehlregulationen intrazellulärer Signalwege kommt, etwa durch Mutationen in den Genen der beteiligten Proteine, kann eine Beeinträchtigung der eigentlichen Zellabläufe bis hin zum Übergang der gesunden Zelle in eine Tumorzelle die Folge sein. Die fehlerhafte Signalweiterleitung in Zellen, ausgelöst durch Mutation, Deletion oder Überexpression von Genen, welche Proteine kodieren, die an der Signaltransduktion inter- oder intrazellulärer Signale beteiligt sind, ist eine der Hauptursachen für die Entstehung bösartiger Tumore. Alle Gene, die Signaltransduktionsproteine kodieren, bezeichnet man deshalb auch als Proto-Onkogene. Ändern sich deren Eigenschaften, so dass sie Tumore auslösen können, bezeichnet man sie als Onkogene. Der Übergang eines Proto-Onkogens in ein Onkogen führt jedoch noch nicht zwangsläufig zu einem gestörten Kommunikationsverhalten von Körperzellen oder zur Ausbildung von Fehlentwicklungen in Gewebeverbänden: Zellen verfügen zusätzlich über ein Arsenal von Kontrollproteinen, die vor allem im Zellkern ausdifferenzierter Zellen die Rückkehr in den Zellteilungszyklus verhindern. Es handelt sich bei diesen Proteinen um sogenannte Nucleäre Tumor-Suppressoren (Rb, p53, wt1 und DCC), die entsprechend ihrer Funktion als Anti-Onkogene bezeichnet werden. Anti-Onkogene verhindern im Zellkern die Aktivierung der DNA-Replikation zum Beispiel durch die Bindung an bestimmte Genregulationsproteine. Kommt es zu einer Veränderung des Erbguts in einem Bereich, der einen Tumorsuppressor kodiert, kann es zum Verlust der Zellzykluskontrolle kommen und somit zu einem unkontrollierten Wachstum ganzer Zellverbände. Analog zu den Anti-Onkogenen haben die nukleären Hormon-Rezeptoren (erbA und NGF1-B), deren Aufgabe es ist, die Wirkung von lipophilen Signalen (z.B. Steroidhormone) durch Steuerung der Transkription spezifischer Gene zu vermitteln.

Die bisher noch nicht erwähnten Onkogene der Signaltransduktion, die nicht an der Signalweiterleitung im Zellkern beteiligt sind, lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Die erste Klasse dieser Signalproteine erfüllt ihre Funktion außerhalb der Zelle. Es handelt sich hier um Proteinliganden wie z. B. *sis*, *hst*, *int-2* und *wnt-1*. Diese Proteine sind homolog zu den Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF und M-CSF). Bei der zweiten Klasse von Signaltransduktionsproteinen handelt es sich um Makromoleküle, die sowohl im Membranbereich



als auch intrazellulär ihre Wirkung entfalten. Zu dieser Kategorie zählen die Membran-Rezeptoren vom Typ I, die sowohl Wachstumsfaktoren als auch Hormone binden können. Diese Rezeptoren tragen auf der dem Zytosol zugewandten Zellinnenseite als katalytischen Teil eine Proteinkinase oder eine Guanylat-Cyclase. Eine weitere Gruppe bilden die Proteinkinasen selbst, die eine zentrale Aufgabe bei der intrazellulären Signalvermittlung wahrnehmen. Die letzte Gruppe, die bei der membranständigen und intrazellulären Signalweiterleitung eine große Rolle spielt, ist die Familie der GTP-bindenden Proteine. Diese Familie von Onkogenen lässt sich grob membranständige G-Proteine und in sogenannte intrazelluläre G-Proteine untergliedern.

## 2.2. GTP-bindende Proteine

Die membranständigen G-Proteine vermitteln die Wirkung extrazellulärer Signale auf Membran-Rezeptoren ins Zellinnere. Bei den G-Proteinen handelt es sich um regulatorische GTPasen, denen allen die  $Mg^{2+}$ -abhängige Bindung von Guaninnukleotiden und die Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Orthophosphat gemeinsam ist. Mit ihrer Eigenschaft, durch die Hydrolyse von GTP zu GDP von einem aktiven in einen inaktiven Zustand überzugehen, wirken diese Moleküle als molekulare Schalter. Der Austausch gebundener Guaninnukleotide wird durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, kurz GEFs (guanine nucleotide exchange factor) gefördert. Im GTP-gebundenen Zustand binden sie an nachgeschaltete Proteine, welche durch konformationelle Änderungen in die Lage versetzt werden, mit anderen Proteinen zu kommunizieren. Durch die Hydrolyse des GTPs zu GDP wird die Wechselwirkung mit dem an die GTPase gekoppelten Protein beendet. Da die Hydrolyse durch die GTPase-eigene intrinsische GTPase-Aktivität sehr langsam ist, kann diese Austauschreaktion durch sogenannte GAPs (GTPase aktivierende Proteine) bis zu einem Faktor von  $10^5$  beschleunigt werden [Ahm97]. Die GAPs kontrollieren somit den Aktivitätszustand des G-Proteins, indem sie die Dauer des aktiven GTP-Zustands verkürzen. Die Guaninnukleotid-bindenden Proteine lassen sich in fünf Superfamilien einteilen: die großen Guaninnukleotid-bindenden Proteine mit helikalen Erweiterungen (Septine), das Signalerkennungspartikel und dessen Rezeptor (SRP54, SR und Ffh), die  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine ( $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$  und  $G_{\alpha q}$ ), die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (EF-Tu, EF-G, IF-2 und RF-3) und die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine.

## 2.3. Die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine

Die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine stellt die größte aller bislang bekannten Proteinfamilien dar. Den Ras-Proteinen kommt eine besondere medizinische Bedeutung zu, da sie in ca. 30 % aller diagnostizierten menschlichen Tumoren und davon in nahezu allen Tumoren der Pankreas, ca. 90 % aller Adenokarzinomen und ungefähr der Hälfte aller Lungentumoren Punktmutationen an den Aminosäurepositionen 12, 13 und 61 aufweisen. Man fand heraus, dass diese Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der intrinsischen und durch GAP beschleunigten Hydrolyse spielen. Mutationen in diesen Positionen können zu einer Herabsetzung der GTPase-Aktivität führen und somit dieses G-Protein in einem permanent aktiven Zustand "einfrieren" [Bar87, Low93].

Im Laufe der Zeit wurde ein ganzes System von Ras-ähnlichen Proteinen, eben die Superfamilie entdeckt. Basierend auf Sequenzhomologien kann diese Superfamilie in weitere Unterfamilien unterteilt werden:

Familie	Mitglieder	Funktion	Literatur
<b>RHO</b> <i>Ras homologue</i>	Rho, Rac, TC10, Cdc42	Zytoskelett, Genexpression, Proliferation	[Mack98]
<b>ARF</b> <i>ADP-ribosylation factor</i>	Arf, Ard, Arl, Sar1, CIN4, Arp	Vesikeltransport	[Jack00, Mos98]
<b>RAG</b> <i>Ras-related GTP-binding protein</i>	Rag und Gtr		[Hir98, Schu95]
<b>RIN</b> <i>Ras-like expressed in neurons</i>	Rin, Ric und Rit	Ca <sup>2+</sup> -Haushalt, Ca <sup>2+</sup> -vermittelte Signaltransduktion	[Lee96, Shao99, Wes96]
<b>RHEB</b> <i>Ras homologue highly enriched in brain</i>	Rheb	Ras-Antagonist synaptische Plastizität	[Yee97]
<b>RAD</b> <i>Ras-like associated with diabetes</i>	Gem, Rem, Kir und Rad	Glucose-Haushalt	[Bil98]
<b>Ran</b> <i>Ras related nuclear protein</i>	TC4 und Ran	Kerntransport	[Moo98]
<b>RAB</b> <i>Ras-like isolated from rat brain</i>	Rab	Vesikeltransport	[Schim98, Sand99]
<b>Ras</b> <i>Ras sarcoma</i>	Ras, Rap, Ral, TC21	Proliferation, Differenzierung, Apoptose	[Voj98]

Die Unterteilung der Ras-ähnlichen Proteine in die entsprechenden Unterfamilien lässt sich anhand der Sequenzhomologien innerhalb der Gruppe und aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in der Effektorregion nachvollziehen.

Neben den Proteinen der Ras-Superfamilie weisen auch alle anderen Proteine der einzelnen Familien der G-Proteine strukturelle Ähnlichkeiten auf. In allen bisher aufgelösten dreidimensionalen Strukturen von GTP-bindenden Proteinen fand man eine G-Domäne, die, wie es scheint, in allen Proteinen dieser Familie hoch konserviert ist. Diese Guaninnukleotid-bindende Domäne trägt zur Bindung des Phosphat- bzw. Guaninnukleotid-Anteils bei, ist notwendig für die räumliche Organisation des  $Mg^{2+}$ -Ions und katalysiert die Hydrolyse des GTP.

## 2.4. Das Ras-Protein

Ras liegt in vier Isoformen verteilt auf drei verschiedene humane Ras-Gene vor: H-, K- (mit den zwei Splice-Varianten 4A und 4B) und N-Ras [Bos97]. Die Proteine wurden vor Bekanntwerden der vier im Menschen existierenden Ras-Varianten wegen ihrer Molekülmasse p21Ras genannt. Das H-Ras, welches auch in dieser Arbeit im Rahmen der Moleküldynamiksimulation zur Komplexbildung mit seinem Effektor AF6 diskutiert wird, ist biochemisch und strukturell am besten charakterisiert und wird nachfolgend als Ras bezeichnet. Für Ras existieren Kristallstrukturen sowohl für die aktive, Gpp(NH)p-gebundene, als auch für die inaktive GDP-gebundene Form [Pai89, Mil90]. Danach setzt sich das Protein aus einem sechs-strängigen gemischten  $\beta$ -Faltblatt umgeben von fünf  $\alpha$ -Helices zusammen. Diese  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices werden durch zehn Loops miteinander verbunden. Der Unterschied zwischen den beiden Strukturen im Gpp(NH)p-gebundenen (GppNHp ist ein GTP-analoges, nicht hydrolysierbares Nukleotid) und GDP-gebundenen Zustand besteht hauptsächlich in den auffälligen Konformationsänderungen beim Übergang von der aktiven in die inaktive Form der beiden Bereiche, die man als Schalter I und Schalter II bezeichnet, während der Rest des Moleküls kaum strukturelle Änderungen durch den Austausch des Guaninnukleotids erfährt. Bei den beiden Schalter I und II handelt es sich um die Loop-Regionen L2 (AS 32-40) und L4 (AS 61-77). Die Röntgenstruktur von C-terminal verkürztem Ras gebunden an GppNHp ist in Abbildung 1 dargestellt [Pai89]. Aus dieser Struktur ließ sich folgern, dass die Loop-Region L1 (AS 10-15) zusammen mit L2 und L4 die  $\gamma$ -Phosphatgruppe bindet. L2 (Schalter I) ist an der Bindung von Effektormolekülen und L4 (Schalter II) an der Wechselwirkung mit GAPs beteiligt. Die in der Abbildung Nr.1 dargestellten konservierten Sequenzmotive PM1 bis PM3 sind an der Phosphat- und  $Mg^{2+}$ -Bindung beteiligt. Die Regionen G1 bis G3 interagieren mit der Guaninbase.

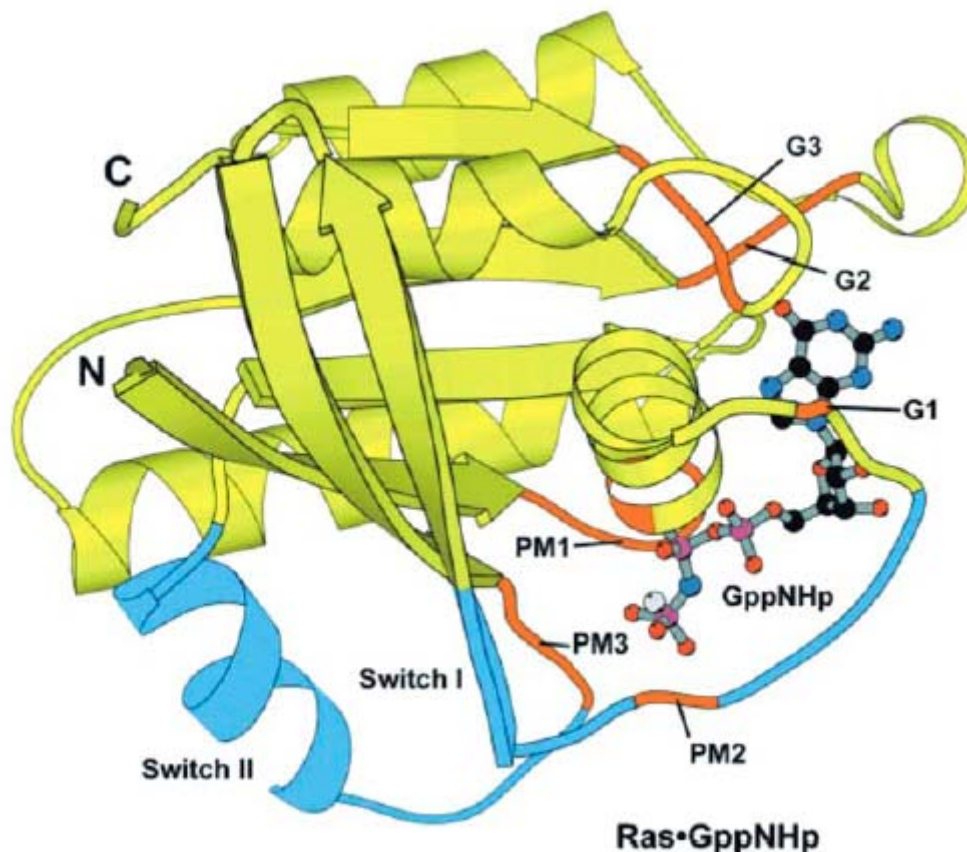


Abbildung 1: Dreidimensionale Röntgenkristallstruktur als Bändermodell von Ras im Komplex mit GppNHp mit den konservierten Sequenzmotiven und den beiden Schalterregionen Switch I und II (entnommen aus [Witt00]).

## 2.5. Das Ras-verwandte Protein Rap1A

Rap1A wird der Ras-Superfamilie zugeordnet und zählt darin zur Unterfamilie der Ras-ähnlichen Proteine. Die Rap-Proteine (Ras proximate) weisen von allen GTPasen dieser Familie die mit 52 % höchste Sequenzhomologie zu Ras auf. Rap findet sich in zahlreichen Organismen in nahezu allen Organisationsstufen.

Bisher sind vier Mitglieder der Rap-Familie, die sich in die beiden Hauptgruppen Rap1 und Rap2 unterteilen lassen, bekannt. Jedes dieser Proteine tritt in den Isoformen A und B innerhalb seiner Hauptgruppe auf.

Die Struktur von Rap1A wurde im Komplex mit der C-Raf1-Kinase bestimmt [Nas95]. Dabei ließ sich die Ras-ähnliche Faltung bestätigen. Zudem konnte anhand der strukturellen Daten auch der Mechanismus der GTP-Hydrolyse erklärt werden [Hor96].

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der strukturellen Daten der Röntgenstruktur von Rap1A eine Komplexstruktur mit der Ras-Bindedomäne seines Effektors AF6 in einer Moleküldynamik

simulation berechnet und analysiert. Im folgenden sollen kurz die strukturellen Unterschiede zwischen Ras und Rap1A herausgearbeitet werden. Im direkten Vergleich der beiden Strukturen konnten trotz der sequentiellen Unterschiede beider Proteine nur geringe strukturelle Abweichungen festgestellt werden, was durch den geringen RMSD-Wert von 0,88 Å beider übereinandergelagerter Strukturen deutlich wird [Nas95]. Während das zentrale  $\beta$ -Faltblatt der G-Domäne hochkonserviert ist, findet man in den Helices kleine Abweichungen von der Ras-Struktur: Während die  $\alpha$ -Helix A3 in Ras leicht verzerrt erscheint, ist sie in Rap einheitlich strukturiert. Die Helix A4 in Rap1A ist im Gegensatz zu Ras n-terminal verlängert, was vermutlich durch das Glu121 in Rap1A bewirkt wird. Zudem ist die  $\alpha$ -Helix A5 ebenfalls länger als in Ras. Die größten Abweichungen der C $\alpha$ -Atome von Ras und Rap1A gemessen am RMSD-Wert finden sich für die Residuen Tyr32, Thr35 und Ile36 und für die Aminosäuren 61-65 in der Helix A2 in Rap1A. Die Region, in der die Bindung von GppNHp und Mg<sup>2+</sup> vermittelt wird, ist ebenfalls hochkonserviert, allerdings ist sie im Falle von Rap1A wesentlich stabiler. Ursache sind die drei starken Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe der Ribose und der Carbonylgruppe von Val29, Glu30 und zwischen der  $\gamma$ -Phosphatgruppe und dem Amid von Gly60 und Thr35.

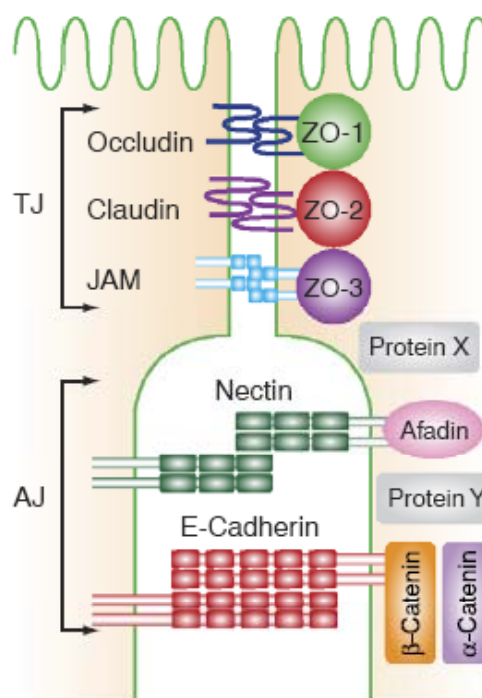
## 2.6. Biologische Funktion von AF6

Das Protein AF6, auch Afadin genannt, wurde im Zusammenhang mit akuter myeloider bzw. akuter lymphoblastischer Leukämie [Pra93] bekannt. Diese molekulare Erkrankung kann durch eine Chromosomentranslokation, bei der ein verkürztes All-1-Gen mit einem anderen Gen fusioniert ist, ausgelöst werden. AF6 hat zwar keinen direkten Bezug zur Krankheit, doch sind bei der akuten myeloiden Leukämie des Typs M1 die All-1 Selbstfusion und die All-1-AF6 Fusion die am häufigsten beobachteten Gendefekte [Poi96].

Diese Beobachtungen ließen jedoch keineswegs einen direkten Schluß auf die Funktion von AF6 zu. Hinweise auf eine mögliche Funktion von Afadin lieferten Mitte der Neunziger Jahre Yonemura und Mitarbeiter, als sie Afadin, Nectin-2 und Ponsin kolokalisiert zusammen mit E-Cadherin und ZO-1 in noch unausgebildeten Zell-Zell-Kontakten im Stadium der Differenzierung dieser interzellulären Verbindungen vorfanden. Während der Bildung von Zell-Zell-Verbindungen einschließlich den Adhärenz-Verbindungen und den Tight Junctions akkumulieren sich Afadin, E-Cadherin, und E-Catenin, Nectin-2 und ZO-1 zuerst an diesen Adhäsionsstellen, von wo aus anschließend das Occludin und möglicherweise auch das Claudin rekrutiert wird [Yon95, And96, Asa99].

Fast zeitgleich entdeckte man ein neues 180 kDa großes Protein, das mit H-Ras interagiert und sequentiell dem menschlichen AF6 (hsAF6) und dem Drosophila-Genprodukt Canoe sehr ähnlich war [Kur96]. Canoe ist ein Effektor von Rap1 und spielt eine große Rolle beim sogenannten Dorsalschluß (dorsal closure) der Drosophilalarve (*Drosophila melanogaster* oder Schwarzbäuchige Taufliege), welcher während der Embryonalentwicklung die Keimstreifverkürzung abschließt. Ähnlich wie AF6 interagiert Canoe dabei mit dem ZO-1

Homolog Tamou [Tak96]. Die Vermutung liegt nahe, dass AF6 ebenso wie Canoe ein Effektor von Ras oder Rap ist und bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten eine wichtige Rolle spielt. Mittlerweile gibt es einige Hinweise für die Rolle von AF-6 bei der Bildung von Adhärenz-Verbindungen und Tight Junctions, die sich auch aufgrund der Domänen des AF-6-Proteins erklären lassen. Indem Nectin mit seiner Carboxy-terminalen PDZ-Bindedomäne an die PDZ-Domäne des AF6-Proteins bindet, kann es E-Cadherin-Komplexe an Zell-Zell-Adhäsionsstellen vereinen, deren Basis Nectin bildet [Tach01]. Die Rekrutierung von JAM (junctional adhesion molecules) und ZO-1 durch Nectin zu den entsprechenden Zell-Zell-Adhäsionsstellen ist ebenfalls von der Bindung des Afadins an die Carboxy-terminale PDZ-Bindedomäne des Nectins abhängig [Man97]. Ein weiterer Hinweis für die Funktion von AF-6 läßt sich in Mäusen, deren Afadin-Genprodukt fehlerhaft ist, ausmachen: Im embryonalen Stadium derartiger Mäuse ist nicht nur die Organisation der Adhärenz-Verbindungen, sondern auch die der Tight Junctions schwer beeinträchtigt [Ike99]. Ein letzter Hinweis für die biologische Funktion von Afadin liegt in seiner Rap1-abhängigen Wechselwirkung mit dem Protein p120<sup>ctn</sup>, welches im Komplex mit AF6 die Endozytose von non-trans-interacting E-Cadherin hemmt und dadurch die Akkumulation von E-Cadherin an Zell-Zell-Adhäsionsstellen zur Bildung von Adhärenz-Verbindungen bewirkt [Myo05]. All diese Hinweise lassen darauf schließen, dass Afadin im System mit Nectin eine wichtige Rolle bei der Organisation der Adhärenz-Verbindungen und den Tight Junctions spielt.



*Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anordnung von Tight Junctions (TJ) und Adhärenz-Verbindungen (AJs) in einer Zelle. Die AJs werden vom Nectin-Afadin- und vom E-Cadherin-Catenin-System gebildet. Afadin ist über das unbekannte Protein X mit ZO-Proteinen und über das Protein Y mit  $\alpha$ -Catenin assoziiert (entnommen aus [Myo05]).*





von Zell-Zell-Kontakten herunter, um Zellen in einen Zustand zu halten, in dem sie sich nicht teilen [Rad03].

AF6 in seiner Funktion als Glied einer Signaltransduktionskette steht wohl im Zusammenhang mit der Regulation der Anordnung von TJs und AJs.

Die bereits oben erwähnte PDZ-Domäne von AF6 hat neben ihrer indirekten Beteiligung an Signaltransduktionswegen auch noch eine andere wichtige Funktion beim Aufbau und bei der Organisation von Adhärenz-Verbindungen. Nectin bindet mit seinem C-Terminus an der PDZ-Domäne von AF6 und stellt damit ein Nectin-Afadin-System her, welches ans Zytoskelett der Zelle bindet. AF6 fungiert in diesem Fall als ein im Zytoskelett lokalisiertes Adapterprotein, welches das Nectin im apikalen Zell-Zell-Verbindungskomplex verankert.

In diesem Abschnitt versteht man den Begriff „Zell-Zell-Verbindungskomplex“ als einen Sammelbegriff für TJs, AJs und Desmosomen. TJs und AJs benötigen zu deren Aufbau bestimmte Proteinkomponenten, die sich am apikalen Zell-Zell-Verbindungskomplex anlagern. Dazu gehören die Proteine JAM, Nectin und E-Cadherin. Die Verankerung und Ordnung dieser Proteine im Aktin-Zytoskelett zu einer funktionierenden Einheit wie sie z.B. eine Adhärenzverbindung (AJ) darstellt, wird auf verschiedene Weise unter anderem auch von Afadin vermittelt. So verankert Afadin beim Aufbau eines AJs nicht nur das Nectin, sondern fixiert auch die Lage des E-Cadherins relativ zum Nectin, welche beide zusammen eine Adhärenzverbindung bilden. Dabei bindet Nectin an der PDZ-Domäne des Afadins und wird mit dessen Hilfe im Aktin-Zytoskelett verankert. Das nun verankerte Nectin-Afadin-System tritt via Afadin mit einem bislang noch unbekannten Protein in Wechselwirkung, welches wiederum mit dem  $\alpha$ -Catenin des E-Cadherin-Catenin-Systems mit dem Zytoskelett verbunden ist.



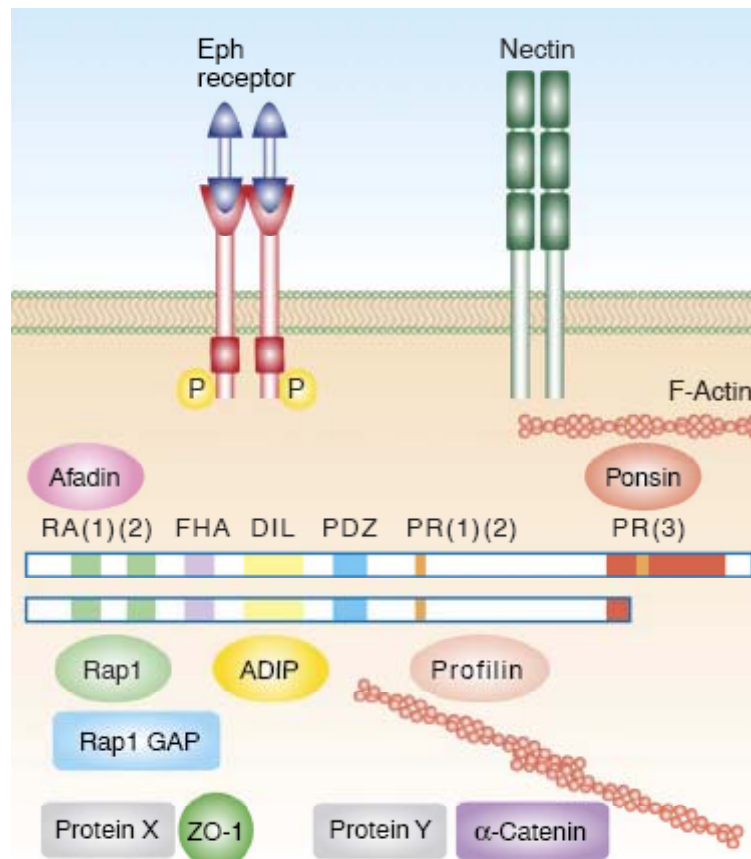


Abbildung 4 zeigt Proteine, die mit dem AF6 assoziiert sind. Afadin (pink oval) hat zwei Isoformen, l-Afadin und s-Afadin. Weil dem s-Afadin die C-terminale F-Aktin-Binde-Domäne (roter Kasten) und die dritte prolinreiche Domäne fehlen, kann es nicht direkt mit F-Aktin und Ponsin interagieren. Die PDZ-Domäne des AF6 wechselwirkt mit dem Zytoplasmatischen Teil von Transmembranproteinen wie z.B. Nectin und dem Ephrin-Rezeptor. Die N-terminale Ras-Bindedomäne von AF6 interagiert mit Rap1, welches Zellwachstumssignale weiterleitet. Die dilute Domäne (DIL) Afadins bindet an ADIP, welches an  $\alpha$ -Actinin bindet (entnommen aus [Myo05]).

Die Vielzahl an Bindungspartnern von AF6, welche alle im Zusammenhang mit Zell-Zell-Kontakten auftreten, legen den Schluß nahe, dass es sich bei AF6 um ein Adapterprotein handelt, dessen Aufgabe es ist, die Komponenten der einzelnen Zell-Zell-Verbindungskomplexe sowohl funktionell als auch räumlich zu strukturieren.

### 2.6.1. Die Ras-Bindedomäne von AF6

Afadin wurde Mitte der neunziger Jahre von Kuriyama und Mitarbeitern [Kur96] als möglicher Bindungspartner von H-Ras entdeckt. Trotz zahlreicher Untersuchungen konnte dem Protein keine enzymatische Aktivität zugeschrieben werden, was die funktionelle Einordnung von AF6 in das Netzwerk der Signaltransduktion erschwerte. Die Festlegung und Bestimmung

der Domänenstruktur von Afadin offenbarte zwei Ras-bindende bzw. Ras-assoziierende Domänen in der N-terminalen Region des Proteins. Für die äußerste der beiden N-terminal gelegenen Ras-bindenden Domänen konnte eine Interaktion mit Rap1 (s.o.) nachgewiesen werden. Um die minimale Ras-bindende Domäne von rnAF6 (aus *Rattus norvegicus*) zu bestimmen, wurden von T. Linnemann im Rahmen seiner Dissertation verschiedene biochemische Untersuchungen durchgeführt [Lin99a]. Dazu wurden in einem ersten Schritt unterschiedlich lange N-terminale Konstrukte von AF6 in einem Zweihybridsystem auf die Bindung an die H-Ras-Mutante G12V getestet. Das stärkste Wachstum der Hefezellen wurde bei der Variante AF6 (1-141) beobachtet. Die Verlängerungen in C-terminaler Richtung wirkte sich eher ungünstig auf das Zellwachstum aus und beim Abtrennen der ersten 30 Aminosäuren war die Latenz bis zur Koloniebildung sehr groß.

Um die Ergebnisse des Zweihybridsystems zusätzlich abzusichern, führte Linnemann noch Affinitätstitrationen des Konstrukts AF6(1-141) mit Rap1A durch, dessen Bindung an AF6 ebenfalls schon gezeigt worden war [Ael94]. Die Dissoziationskonstante  $k_D$  lag für den Komplex Rap1A•mGpp(NH)p und AF6(1-141) bei 0,20  $\mu$ M (bei 26°C).

Nachdem AF6 im Vergleich zu anderen Ras-Effektoren keine enzymatische Aktivität besitzt, soll die Ras-Bindedomäne, kurz (RBD) von AF6 mit den Strukturen der bereits bekannten Ras-Effektoren verglichen werden. Es stellt sich die Frage, ob AF6-RBD wie diese auch einen Ubiquitin-Fold aufweisen würde.

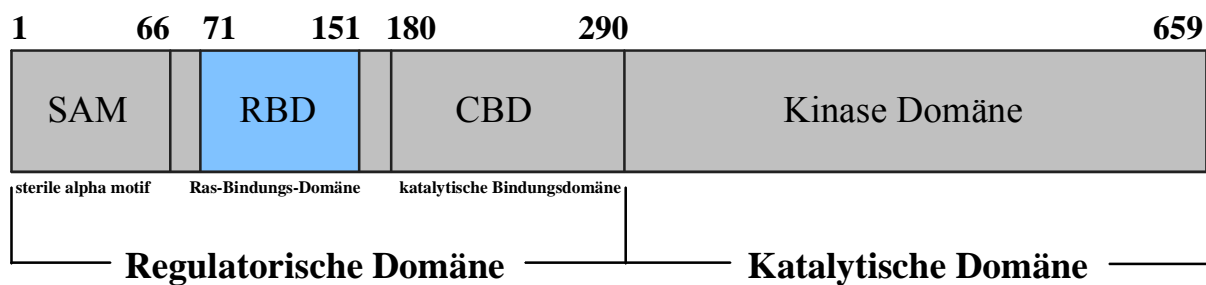
## 2.7. Biologische Funktion des Ras-Effektors Byr2

Byr2 ist eine Ser/Thr-spezifische Protein-Kinase, welche Signale zur sexuellen Differenzierung in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* vermittelt. Die Spalthefe *S. pombe* hat nur ein einziges Ras-Gen, das **ras1**, welches zum einen für die Antwort auf Pheromone und zum anderen für die Aufrechterhaltung der Zellform notwendig ist [Fuk86, Nad86]. Zellen ohne Ras1 können nicht konjugieren, sie sporulieren mit verminderter Rate und sie sind rund statt stabförmig. H-Ras kann die Effekte von Ras1 komplementieren. Ras1 bindet und aktiviert die Byr2-Proteinkinase (Byr, bypass of Ras), welches ein Homolog zu dem in Säugetieren vorkommenden MEKK [Mas95, Ael93] ist. Genetische Analysen und Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass Byr2 eine andere Kinase, die Byr1-Proteinkinase aktiviert, welche infolge eine weitere Kinase, die Spk1-Kinase stimuliert [Byr01, Nad88]. Diese Proteinkinasen gehören zu den sogenannten MAPK-Modulen, welche einige Homologien zu den MAPK-Modulen in Säugetieren aufweisen. Die Aktivierung von MAP-Kinase-Signaltransduktionswegen über die GTPase Ras ist ein in der Evolution konservierter Signalübertragungsweg, der in verschiedensten zellulären Zusammenhängen gefunden wird. Neben Ras1 wird Byr2 zusätzlich noch durch die beiden Proteine Ste4 und Gpa1 reguliert. Ste4 spielt eine wichtige Rolle bei der Konjugation und der Sporulation. Dabei bindet es Byr2

mittels einer Interaktion der SAM-Region (sterile alpha motif) von Byr2 [Byr01, Tu97, Oka91, Pon95, Barr96].

Gpa1, das zweite Byr2-regulierende Protein, ist die  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins, welches durch die Bindung von Pheromonen (M- oder P-Faktor) stimuliert wird. Die Pheromone binden an einem Rezeptor mit sieben transmembranalen Helices [Kit91; Tan93]. Fehlt einer Hefezelle die Gpa-Funktion, kann sie weder sporulieren noch konjugieren [Oba91].

Um in weiterführenden Arbeiten biochemische und strukturelle Untersuchungen vornehmen zu können, musste im Vorfeld die Domänenstruktur der Proteinkinase Byr2 aufgeklärt werden. Hierfür versuchte man einen möglichst kurzen Sequenzabschnitt zu finden, der sich zum einen in seiner nativen Form faltet und dieselbe biologische Funktion ausübt, wie im vollständigen Protein, zum anderen aber auf jede weitere Verkürzung mit einer Funktionseinschränkung reagiert. Dafür braucht man geeignete biochemische Testverfahren, wie z. B. der Wert der Bindungskonstante zum Bindungspartner. Nach entsprechenden biochemischen Untersuchungen konnte eine Vorstellung der Byr2-Domänenstruktur [Tu97, Bau98] gezeigt werden.



*Abbildung 5: Die Domänenstruktur von Byr2. Die Regionen der einzelnen Domänen des Proteins sind anhand von Zahlen in der sequentiellen Reihenfolge dargestellt.*

Byr2 hat eine N-terminale regulatorische Domäne und eine C-terminale Kinasedomäne. Die regulatorische Domäne, welche die Aminosäure 1 bis 394 umfasst, beinhaltet ein sogenanntes sterile alpha motif (SAM, Aminosäuren 1 bis 66), eine Ras-Bindungs-Domäne (RBD, Aminosäuren 71 bis 151) und eine katalytische Bindedomäne (catalytic binding domain: CBD, Aminosäuren 180 bis 290).

### 2.7.1. Die bisherige Strukturvorstellung von Byr2-RBD

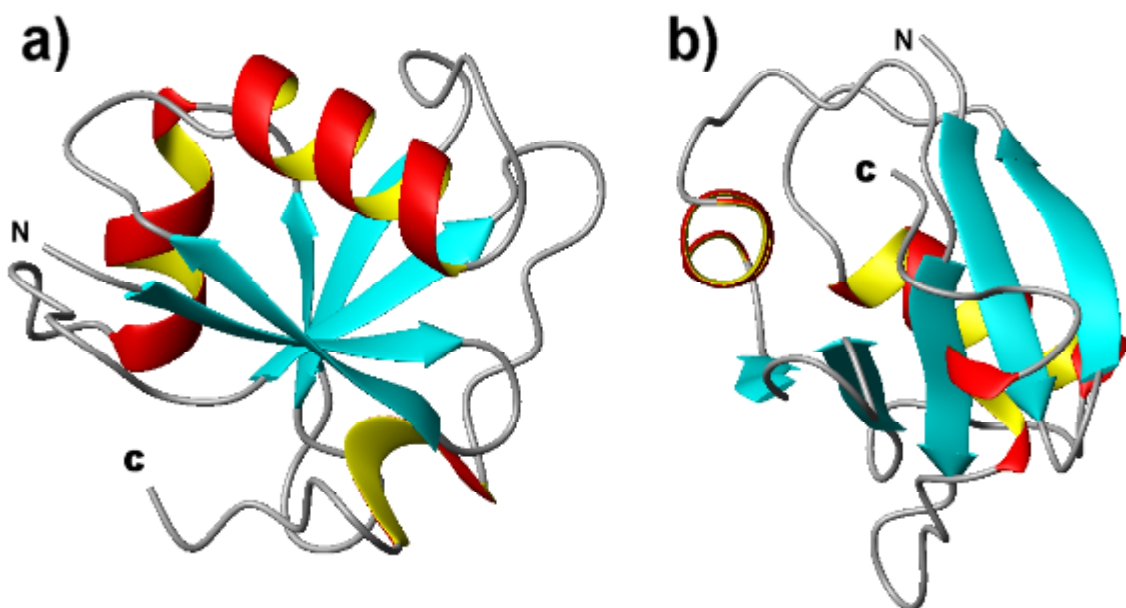
Byr2 teilt als ein Effektor von Ras mit allen anderen Ras-Effektoren ein gemeinsames Charakteristikum: die Ras-Bindedomäne, mit der das kinaseaktive Molekül in die Lage versetzt wird, mit Ras zu interagieren und daraufhin zellulär zu reagieren. Aus bisher veröffentlichten strukturellen Untersuchungen weiß man, dass die Bindung von Ras-Effektoren durch Ras-Moleküle über ein sich bildendes intermolekulares  $\beta$ -Faltblatt erfolgt, welches

hauptsächlich durch polare Wechselwirkungen zwischen der Switch I-Region von Ras und dem  $\beta$ -Faltblattsystem einer RBD stabilisiert wird.

Die Tatsache, dass Byr2 im Hinblick auf seine Primärsequenz nur wenig mit anderen Ras-Effektoren verwandt ist, machte das Molekül für strukturelle Untersuchungen interessant. Liegt der Wechselwirkung beider Moleküle – Byr2 und Ras1 – vielleicht ein ganz anderer Mechanismus zugrunde?

Die NMR-Struktur der Byr2-RBD wurde am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie im Rahmen der Dissertation von Fritz Huber [Byr01] aufgeklärt. Alle weiteren Verweise und Beschreibungen in der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf die hier erwähnte dreidimensionale NMR-Struktur der Ras-Bindedomäne von Byr2.

Der strukturelle Aufbau dieser Ras-Bindedomäne erwies sich verglichen mit den bisher bekannten Strukturen anderer RBDs als weitgehend identisch. Byr2 besteht aus einem fünfsträngigen gemischten  $\beta$ -Faltblatt, welches durch zwei  $\alpha$ -Helices ergänzt wird. Bei diesem Proteinfaltungsmuster spricht man von einem Ubiquitin  $\alpha/\beta$ -roll. Die fünf N-terminalen Aminosäuren sind ebenso wie die letzten 22 C-terminalen Aminosäuren (ab Arg89) flexibel und haben keine definierte Sekundärstruktur.



*Abbildung 6: a und b zeigen die Darstellungen der Sekundärstrukturelemente des Moleküls Byr2 in zwei verschiedenen Orientierungen. Sie zeigen das fünfsträngige gemischte  $\beta$ -Faltblatt (cyan) und die drei  $\alpha$ -Helices (rot/gelb).*

Der hier betrachtete Abschnitt des Byr2-Moleküls reicht in seiner Domänenstruktur von den Aminosäuren 71 bis 152: Die RBD von Byr2 hat eine globuläre Faltung (s. Abbildung 6) und besteht aus drei  $\alpha$ -Helices (H1: Tyr91-Phe102, H2: Glu127-Phe133, H3: Phe155-Leu158) und einem fünfsträngigen gemischten  $\beta$ -Faltblatt in der Abfolge B1 (Ile72-Ala77), B2 (Thr82-Gln86), B5 (Leu143-Val146), B3 (Ile111-Ser115) und B4 (Ile120-Thr124). Das erste  $\beta$ -

Faltblatt B1 und das zweite Element B2 stehen zueinander antiparallel, während B5 parallel zu B1 und antiparallel zu B3 angeordnet ist. B4 verläuft antiparallel zu B3.

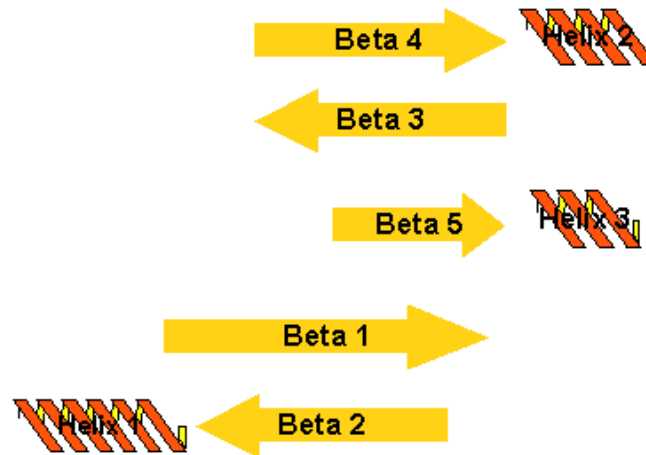


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Lage der Sekundärstrukturelemente in Byr2-RBD.

## 2.8. Der Ras-Effektor Nore1

Nachdem man Nore1 als einen Effektor von Ras entdeckt hatte, fragte man sich, welche biologische Funktion dieses Protein besitzt. Einen ersten Hinweis auf die Beantwortung dieser Frage lieferte die Zugehörigkeit von Nore1 zur RASSF1-Genfamilie. RASSF1 zählt zu den Vertretern der Tumorsuppressoren, deren Genprodukte Zellwachstum und Zelldifferenzierung inhibieren. Sequenzvergleiche zeigten, dass sich im RASSF1-Gen eine Ras-assoziierte (RA) Domäne befindet und dass dessen Genprodukt in zwei Hauptspleißvarianten A und C gebildet werden [Dam00]. Einen indirekten Schluß auf die Funktion von Nore1 läßt die Entdeckung zu, dass die Spleißvariante C von RASSF1 das Ras in einer GTP-abhängigen Weise bindet und eine wirksame Ras-abhängige Apoptose vermittelt [Vos00].

Die Ergebnisse aus sogenannten Pulldown-Experimenten zeigen, dass Nore1 mit der pro-apoptotischen S/T-Proteinkinase MST1 (487 Aminosäuren) wechselwirkt [Kho02], wodurch die Vermutung bekräftigt wird, dass Nore1 an der Hemmung des Zellwachstums beteiligt ist bzw. eine apoptotische Wirkung in der Zelle hat. Für eine Interaktion zwischen Nore1 und MST1 ist auf Seite von Nore1 das Proteinsegment der Aminosäuren 358-413 wichtig. Für die Wechselwirkung mit Nore1 sind auf Seite von MST1 die Aminosäuren 456-487 verantwortlich.

Interessante Hinweise auf die Funktion von Nore1 lieferte auch die Entdeckung, dass Nore1 mit seiner N-terminalen Hälfte mit dem Protein Rassf1A, das als Tumorsuppressor bekannt

ist, heterodimerisiert [Dam00, Ort02]. Durch gleichzeitige Bindung von MST1 wird ein Effortorkomplex aus Nore1-MST1•Rassf1A-MST1 gebildet. Dieser Komplex bindet an aktiviertes Ras und wird anschließend zur Membran rekrutiert. Nach diesen Erkenntnissen wurde für die Funktion von Nore1 postuliert, dass es sich dabei um ein Adapterprotein handeln könnte, welches den Kontakt zwischen den Tumorsuppressoren Rassf1, der Serin/Threonin-Kinase MST1 und aktiviertem Ras vermittelt.

Das Protein Nore1 (*NOvel Ras Effector*) ist ein Produkt der Nore1/Rassf1 Genfamilie, zu welcher fünf Mitglieder zählen: Rassf1, 2, 3, Ad037 und Nore1.

Nore1 wurde in einem Hefe 2-Hybrid Assay mit C-terminal verkürztem und konstitutiv aktivem RasG12V in einer Maus-T-Zellen cDNA-Bank gefunden [Vav98]. In derselben Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass Nore1 sowohl mit Ras als auch mit Rap1B interagiert. Mit dem hierfür eingesetzten Pull Down Assay mit isoliertem GST-Nore1 (AS 188-413) und Ras G12V wurde gezeigt, dass Nore1 mit der GTP-Form des Ras-Proteins wechselwirkt und dass es durch EGF (Epidermal Growth Factor)-Stimulation an Ras in vivo gebunden wird. Diese Entdeckung legte nahe, dass es sich bei Nore1 um einen Effektor von Ras handelt.

Neuere Erkenntnisse zur biologischen Funktion von RASSF-Genprodukten ist deren Fähigkeit, an Mikrotubuli zu binden und diese zu stabilisieren. Dadurch kann zum einen die Mitose blockiert und zum anderen die Zellwanderung in andere Gewebe verhindert werden [Mos06, Dal05]. Die Anlagerung von RASSF-Proteinen an das mikrotubuläre Netzwerk vermittelt lediglich ein Bereich von ca. 160 Aminosäuren, welcher eine mutmaßliche Ras-assoziierende Domäne (RA) beinhaltet. Diese kürzlich entdeckte RA befindet sich im Gen von Nore1A und dessen kürzerer Splice-Variante RAPL, welche ebenfalls an Mikrotubuli binden kann. Die Arbeitsgruppe von Christian Herrmann [Stie06] hat die Effekte von Nore1-RBD auf den Aufbau und die Organisation von Mikrotubuli untersucht. Stieglitz et al. [Stie06] gelang es, die Polymerisation von reinen Mikrotubuli aus dem Gehirn durch die Zunahme von Lichtstreuungseffekten bei einer Wellenlänge von 350 nm verfolgen. Es zeigte sich, dass durch Zugabe von Nore1A-RBD in eine Lösung von  $\alpha/\beta$ -Tubulin die Ausbildung eines Mikrotubulin-Netzwerkes erfolgte. Da Taxol unter denselben experimentellen Bedingungen ebenfalls zu einer Anreicherung von Mikrotubuli führte, jedoch der Lichtstreuungseffekt um das 5-fache niedriger ausfiel, folgerte man, dass Taxol lediglich den Aufbau von einfachen Mikrotubuli katalysiert. Als Grund für den im Vergleich zum Taxol erhöhten Lichtstreuungseffekt bei der Zugabe von Nore1A-RBD vermutete man, dass das Protein neben dem Aufbau der Mikrotubuli auch die Bündelung derselbigen fördert. Tatsächlich konnte durch die Behandlung von Tubulin mit einem immunofluoreszierenden Antikörper gezeigt werden, dass Taxol den Aufbau von Mikrotubuli fördert, während Nore1A zusätzlich die Bildung verdickter und verlängerter Mikrotubuli hervorruft. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen wurde berichtet, dass die Expression von RASSF1A in Zell-Assays eine verdickte und gebündelte Morphologie der Mikrotubuli bewirkte [Dal04]. Inkubierte man Ras•GppNHp in einer Lösung mit Nore1-RBD und gab man anschließend Tubulin dazu, konnte man eine rasante Auflösung der Trübung in der Lösung feststellen. Vollzog man dieselbe Routine mit inaktivem GDP-gebundenen Ras, konnte dagegen keine signifikante Auflösung der Trübung in der Probelösung bemerkt werden.



Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass die Tumorsuppressorwirkung von Nore1A maßgeblich von dessen Fähigkeit abhängig ist, sich mit Mikrotubuli zu assoziieren. Ras wirkt dabei als negativer Regulator.

### 2.8.1. Domänenstruktur von Nore1

Nore1 ist ein 413 Aminosäuren großes Protein mit einer Molekularmasse von 46,4 kD und einem pI von 9,41. Somit handelt es sich bei Nore1 um ein basisches Polypeptid.

Am N-Terminus des Proteins befindet sich eine prolinreiche Region, die ab Aminosäure 95 in der Sequenz von einer C1-Domäne abgelöst wird. Die prolinreiche Domäne ist in fünf PXXP-Sequenzen unterteilt (Aminosäuren 17-20: PEPP; 31-34: PPPP; 34-37: PARP; 77-80: PVRP; 105-108: PQDP), bei denen es sich um mögliche SH3-Domänenbindestellen handeln könnte. Die Ras Bindedomäne von Nore1, welche in dieser Arbeit Gegenstand weiterer Untersuchungen ist, nimmt in der Proteinsequenz mit 160 Aminosäuren den größten Raum in der Domänenstruktur des Proteins ein. Wie bereits oben beschrieben, erfolgt die Bindung von aktiviertem Ras an diesem Proteinabschnitt und unterdrückt in diesem komplexierten Zustand den Aufbau eines Mikrotubuli-Netzwerkes. Im C-terminalen Ende des Proteins befindet sich eine abschließende Coiled Coil-, kurz CC-Domäne, die für die Bindung von Nore1 an MST1 eine wichtige Rolle spielt. Man vermutete dabei, dass die Wechselwirkung mit MST1 über eine Heterooligomerisierung der CC-Domäne stattfindet. Tatsächlich konnte in Modellierungsversuchen für diese beiden Domänen ein antiparalleles Heterodimer vorausgesagt werden [Cre96].

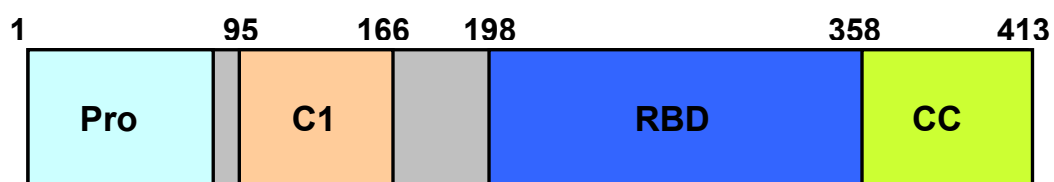


Abbildung 8: Domänenstruktur von Nore1: türkis: Prolinreiche-Region, gelbbraun: C1-Domäne, grau: RBD und hellgrün: die MST-bindende CC-Domäne.

## 2.9. NMR-Spektroskopie

### 2.9.1. Physikalische Grundlagen

Die großen Fortschritte in der Biochemie ermöglichten in den letzten 20 Jahren die Entdeckung einer Vielzahl von biologischen Makromolekülen und deren funktionelle Einordnung in der Zelle. Ein interessierendes Protein konnte ebenfalls durch biochemische Methoden wie z. B. dem Edmann-Abbau von Aminosäuren in seiner Primärsequenz bestimmt werden. Wirkungsweise und Funktion eines solchen Makromoleküls lassen sich letztlich über molekularbiologische Untersuchungen erschließen. Mutationsanalysen am lebenden Organismus, bei denen das auf seine Funktion zu untersuchende Protein in einer mutierten oder nicht mehr expressionsfähigen Form im Genom gegen das natürliche Genom ausgetauscht wird, können Rückschlüsse auf die Aufgabe des entsprechenden Moleküls im Organismus zulassen. Gelingt es uns, durch diese Methoden ein Protein hinsichtlich seiner Funktion im lebenden System einzuordnen, stellt sich die Frage, wie sich die Interaktion mit anderen Molekülen im Detail gestaltet. Der Zusammenhang zwischen der Proteinstruktur und der Aminosäuresequenz des Proteins ist jedoch noch nicht hinreichend bekannt, um von der Sequenz allein auf die Struktur schließen zu können. Mit den heutigen Methoden läßt sich die Struktur eines Proteins ausgehend von seiner Primärstruktur bis hin zu seiner Tertiärstruktur und somit zu seinem dreidimensionalen Aufbau untersuchen. Die Kenntnis der Molekülstruktur in seiner nativen Faltung eröffnet bei atomarer Auflösung der Proteinstruktur die Möglichkeit, die Wechselwirkung des untersuchten Moleküls mit seinen Interaktionspartnern zu verstehen.

Von den 36906 in ihrer Struktur bisher aufgeklärten Proteine wurden 31653 röntgenkristallographisch bestimmt (Stand Nov. 2006) [RCBS]. Der kleinere Teil der Strukturen konnte entweder mit der Elektronenmikroskopie oder der im Vergleich zu Röntgenkristallographie wesentlich jüngeren Methode der NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Während die routinemäßige Bestimmung von Proteinstrukturen mittels NMR-Spektroskopie aufgrund mangelnder Automatisierung bei der Signalauswertung sehr lange dauert, ist der zeitliche Aufwand bei der Röntgenstrukturanalyse aufgrund des hohen Automatisierungsgrades sehr gering, vorausgesetzt, es gelingt die Zucht des hierfür notwendigen Einkristalls aus der Proteinprobe. Zudem gibt es bezüglich der Molekülgröße für die Röntgenkristallographie im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie keine obere Grenze. Durch die Einführung der sogenannten *Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy* (TROSY) [Per97, Sal98] in der NMR-Spektroskopie konnte die Obergrenze von vormals 20-30 kDa auf über 50 kDa angehoben werden.

Bezieht man sich bei der Wahl der Methode lediglich auf Molekülgröße und den zeitlichen Aufwand, der mit der Strukturaufklärung verbunden ist, würde sie bei oberflächlicher



Betrachtung auf die Röntgenkristallographie fallen. Die Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie bietet aber dennoch viele Vorteile, die gerade bei der Untersuchung von Biomolekülen von großer Bedeutung sind:

- Die NMR-Spektroskopie eignet sich zur Untersuchung biologischer Makromoleküle, weil diese in gelöster Form unter annähernd physiologischen Bedingungen bezogen auf pH-Wert und Ionenkonzentration des Puffers analysiert werden können. Die zeitlimitierende Größe bei der Röntgenstrukturanalyse ist die Kristallisation des Moleküls. Häufig gelingt dieser rein empirische Schritt nur unter unphysiologischen pH-Bedingungen, was die Aussagefähigkeit der damit errechneten Struktur abschwächt.
- Die NMR-Spektroskopie erlaubt es, dynamische Prozesse von Molekülen in einem breiten Zeit- und Frequenzbereich ( $10^{-4}$  Hz bis  $10^{10}$  Hz) zu studieren.
- Mit modernen molekularbiologischen Methoden lassen sich eine Vielzahl von Proteinen isotonenmarkiert für zwei – und dreidimensionale NMR-Experimente mit einem hohen Reinheitsgrad herstellen.

Die NMR ist in einem starken Maße einer Größenlimitation der untersuchten Proteinprobe unterworfen. Durch neuere Entwicklungen, wie die TROSY-Spektroskopie [Per00] haben sich die Möglichkeiten der NMR beträchtlich erweitert, mittlerweile können Proteine einer Länge von bis zu 300 Aminosäuren in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Das zu beobachtende Molekül muss jedoch in Wasser löslich sein und darf bei einer Konzentration von  $> 1$  mM nicht aggregieren. Eine Messung kann zudem nur dann erfolgreich sein, wenn die hochkonzentrierte Proteinprobe über die Dauer der Messzeit (Minuten bis Tage) chemisch stabil bleibt.

Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments eines Atomkerns mit einem externen magnetischen Feld. Jedoch haben nur diejenigen Atomkerne ein magnetisches Moment  $\mu$ , deren Kerne eine ungerade Anzahl von Protonen und eine gerade Anzahl von Neutronen (z.B.  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$  oder  $^{19}\text{F}$ ) oder eine gerade Anzahl von Protonen und eine ungerade Anzahl von Neutronen (z.B.  $^3\text{He}$ ,  $^{17}\text{O}$  und  $^{41}\text{Ca}$ ) besitzen.

Der Eigendrehimpuls  $P$  und das magnetische Moment  $\mu$  sind zueinander direkt proportional:

$$\mu = \gamma P$$

*Gleichung 1*

Für jede Kernsorte gibt es eine charakteristische Proportionalitätskonstante  $\gamma$ , die als gyromagnetisches Verhältnis bezeichnet wird.

Der Eigendrehimpuls  $P$  orientiert sich in einem äußeren Magnetfeld so, dass für seine Komponente in der Feldrichtung ( $P_z$  – das Magnetfeld verlaufe in z-Richtung) ein ganz oder halbzahliges Vielfaches des Planckschen Wirkungsquantums<sup>1</sup> ist:

$$P_z = \hbar m_I$$

*Gleichung 2*

Die magnetische Quantenzahl  $m$  charakterisiert den betreffenden Eigenzustand des Kerns und kann ganzzahlige Werte von  $-1$  bis  $+1$  in Abhängigkeit der Spinquantenzahl  $I$  annehmen. Für  $m_I$  gilt:

$$m_I = I, I-1, I-2, \dots, -I$$

*Gleichung 3*

Die Zahl der möglichen Eigenzustände eines Kerns ist somit  $2I + 1$ . Legt man nun bei Kernen mit  $I = 1/2$  ein äußeres Magnetfeld  $B_0$  an, nehmen deren Spins eine parallele bzw. antiparallele Orientierung an, deren Übergangsfrequenzen (Lamor-Frequenz) zwischen zwei Kernspinniveaus gemessen werden können.

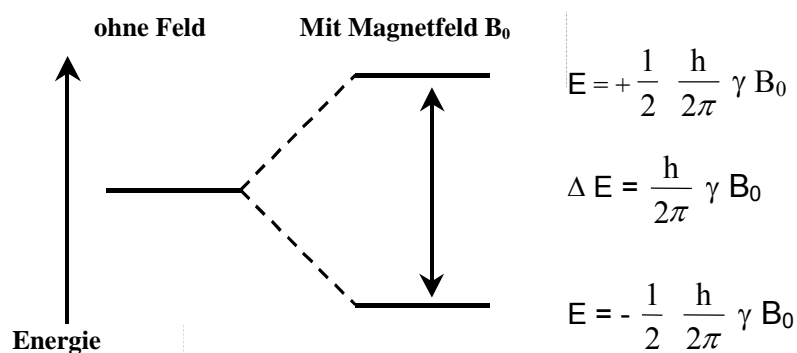


Abbildung 9: Aufspaltung eines Energieniveaus für einen Kern mit Spin  $I = 1/2$  in einem statischen Magnetfeld  $B_0$ .

<sup>1</sup>  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ ; wobei  $h$  das Plancksche Wirkumsquantum ( $6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-1}$ )

Die magnetische Komponente des magnetischen Moments  $\mu$  kann sich jetzt parallel ( $N_0$ -Zustand) oder antiparallel ( $N_1$ -Zustand) zur Achse des äußeren Magnetfeldes ausrichten. Es befindet sich stets ein kleiner Überschuß Protonen im Grundzustand  $N_0$ .

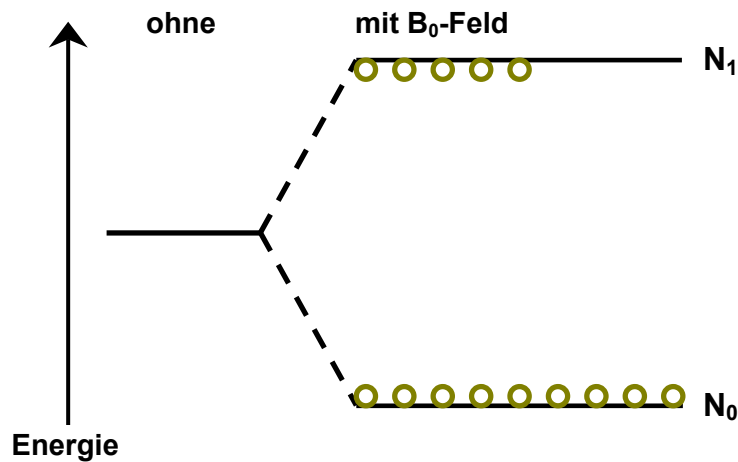


Abbildung 10: Ein kleiner Überschuß an Protonen befindet sich im energieärmeren Grundzustand  $N_0$ .

Da die Anzahl der Kerne im Grundzustand  $N_0$  größer als im angeregten Zustand  $N_1$  ist, resultiert eine makroskopische Magnetisierung  $M_0$ . Für den Übergang in den  $N_1$  Zustand wird ein Energiequant vom Betrag

$$\Delta E = h \nu_0 = 2\mu_z B_0 = \gamma \hbar B_0$$

Gleichung 4

oder Strahlung der Frequenz

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

Gleichung 5

benötigt.

Die Resonanzfrequenz  $\nu_0$  ist abhängig vom gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  und ist dem äußeren Feld  $B_0$  proportional. Gleichung 5 ist die fundamentale Bedingung für die magnetische Kernresonanzabsorption.

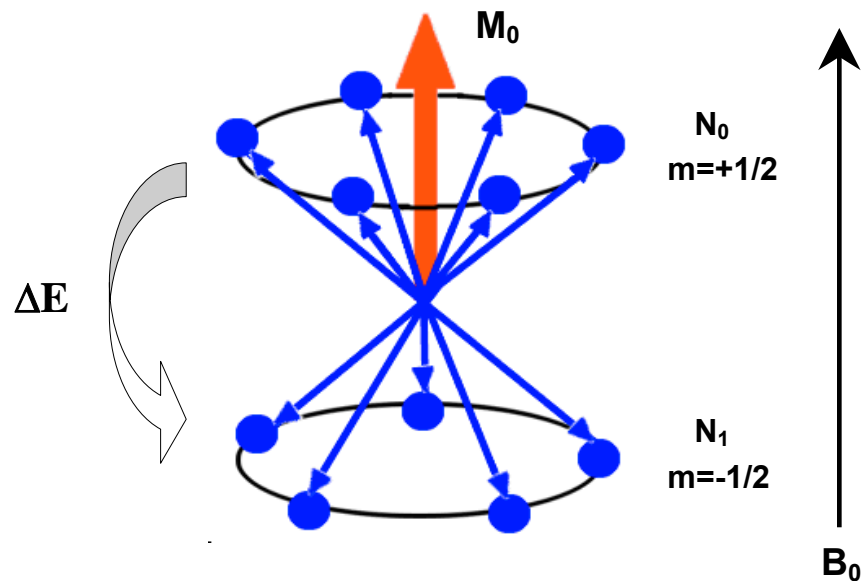


Abbildung 11: Ausbildung der aus dem thermischen Gleichgewicht resultierenden Magnetisierung.

Wird Energie in der Frequenz eingestrahlt, die der Energiedifferenz zwischen den beiden Energieniveaus entspricht, lassen sich Übergänge zwischen den einzelnen Energieniveaus induzieren. Die eingestrahlte Energie wird also vom Kern aufgenommen und zum Übergang in den höheren Energie- (Spin-) Zustand verwendet.

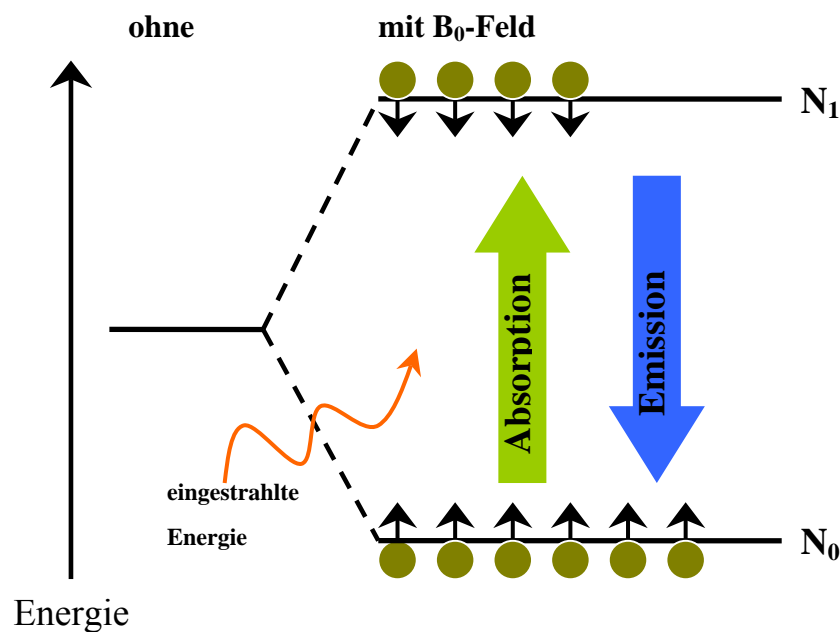


Abbildung 12: Eingestrahlte Energie wird vom Kern aufgenommen und führt zum Übergang in den höheren Spinzustand.

In der NMR macht man sich die Möglichkeit zu Nutze, durch eingestrahlte Energie den Spinzustand eines Kernes auf ein anderes energetisches Niveau zu bringen. Das starke äußere Magnetfeld des NMR-Spektrometers polarisiert die Kernspins, so dass eine makroskopische Magnetisierung  $M_0$  entlang der Feldrichtung in z-Richtung resultiert. Läßt man nun auf ein Spinsystem einen hochfrequenten Puls von definierter Dauer einwirken, wird der Vektor  $M_0$  der makroskopischen Magnetisierung aus der z-Achse in die xy-Ebene gedreht (Abbildung 13).

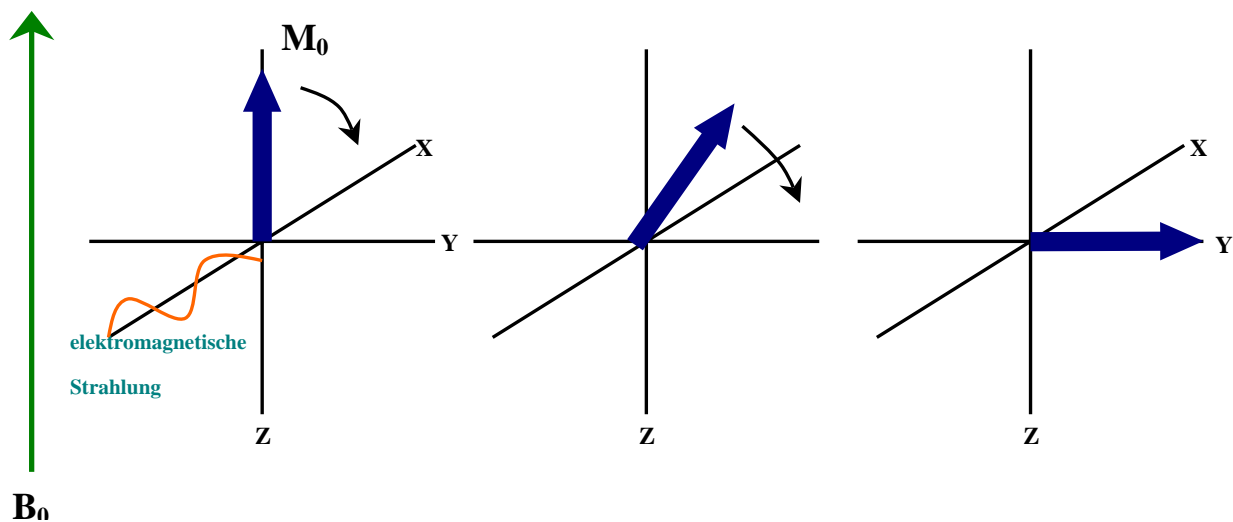


Abbildung 13: Wenn die Resonanzbedingung erfüllt ist, kommt es durch die absorbierte Energie zur Auslenkung des makroskopischen Magnetisierungsvektors  $M_0$  in y-Richtung.

Der Drehwinkel (hier  $90^\circ$ ) ist von der Kernart und der Dauer des einwirkenden Pulses (Präparationspuls) abhängig. Die transversale Magnetisierung in der xy-Ebene präzediert unter dem Einfluß des statischen Magnetfeldes  $B_0$  mit der Resonanzfrequenz (Larmorfrequenz)  $\nu_0$ .

Nach dem Anregungspuls beginnen die Kerne ins thermische Gleichgewicht zurückzukehren. Dabei verlieren sie Energie durch Emission von elektromagnetischer Strahlung (s. Abbildung 12) die durch eine Detektionsspule im Spektrometer gemessen werden kann. Dieser nach dem HF-Puls einsetzende Prozess ist unter dem Begriff "Relaxation" bekannt und ist eine Folge örtlich und zeitlich modulierender Wechselwirkungen der Kernspins mit ihrer Umgebung. Bei der Analyse von Proteinen spielen die beiden wichtigsten Ursachen der Relaxation eine wichtige Rolle. Die dipolare Wechselwirkung des Spins ist für die Protonen, die den Hauptbestandteil von Proteinen darstellen, von wesentlicher Bedeutung. Sie fällt mit  $r^{-6}$  ab und ihre Zeitabhängigkeit entsteht durch die Brownsche Molekularbewegung des Gesamtmoleküls oder durch interne Bewegungen. Eine weitere die Relaxation beeinflussende Größe stellt die Anisotropie der chemischen Verschiebung dar, in der sich die charakteristischen Unterschiede in den Resonanzfrequenzen einzelner Kerne widerspiegeln. Diese "chemische Verschiebung" wird

durch die partielle Abschirmung des äußeren Feldes durch lokale Elektronendichten verursacht. Daher wirkt am Ort des Kerns nicht die Feldstärke  $B_0$ , sondern das effektive Feld  $B_{\text{eff}}$ . Aussagen über die räumliche Struktur eines Moleküls sind letztlich nur durch die Auswertung dieser beiden Effekte möglich, da sie die charakteristischen Unterschiede eines jeden Kerns an seinem Ort beschreiben.

## 2.9.2. Methodische Entwicklung in der NMR

Die Kernresonanzspektroskopie beruht auf dem Vorhandensein eines Eigendrehimpulses (des Spins) eines Atomkerns und der damit verbundenen Wechselwirkung von Atomkernen mit einem äußeren Magnetfeld, mit der Wechselwirkung der Kerne untereinander, mit der Wechselwirkung der Elektronenhülle des eigenen Atoms und den Elektronen des gesamten Moleküls. Durch ihre vielfältigen Möglichkeiten, einen Atomkern eindeutig zu charakterisieren wurde die NMR zu einer der wichtigsten spektroskopischen Methoden unserer Zeit.

Vom ersten experimentellen Nachweis des Protonenspins durch Otto Stern mit seinem Molekularstrahlexperiment bis zum ersten hochaufgelösten NMR-Signal, einem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Ethanol im Jahre 1951 [Arn51] vergingen drei Dekaden physikalischer Grundlagenforschung. Otto Stern und Walther Gerlach, die 1922 in Frankfurt mit dem berühmten Stern-Gerlach-Experiment den Elektronenspin nachweisen konnten, zeigten im Jahre 1933, dass ein Protonenstrahl durch ein Magnetfeld in zwei Hälften geteilt wird, die den beiden Spinzuständen zugeschrieben wurden. Isidor Isaac Rabi, der 1944 den Nobelpreis für Physik erhielt, führte aufbauend auf die Stern-Gerlach-Versuchsanordnungen erste NMR- und ESR-Experimente durch. Ihm gelang der Nachweis, dass einer der Halbstrahlen verschwindet, wenn man mit Hilfe eines Magnets elektromagnetische Strahlung von geeigneter Frequenz (die Larmorfrequenz) auf ihn einstrahlt. Mit Felix Bloch und Edward Mills Purcell, die im Jahre 1946 unabhängig voneinander NMR-Experimente in flüssiger und fester Phase durchführten, gewann diese Methode zunehmend an Bedeutung (Nobelpreis für Physik 1952).

Kurz darauf entdeckte man die Aufspaltung der Spektren durch chemische Verschiebung und skalare Kopplung, womit sich die NMR-Spektroskopie zu einer wichtigen Analysemethode in der Chemie entwickelte. Anfangs kamen überwiegend CW-Spektrometer (*continuous wave*) zum Einsatz. In dieser NMR-Methode werden entweder durch Variation der Frequenz oder durch Änderung des Feldes die Resonanzen nacheinander angeregt. Der Nachteil dieser Methode lag im sehr schlechten Signal/Rausch-Verhältnis. Mitte der 60er Jahre entwickelte Richard R. Ernst (Nobelpreis für Chemie 1991) ein Puls-Fourier-Transformations-NMR-Spektrometer (FT-NMR). Diese Methode ermöglichte verglichen mit der CW-NMR-Spektroskopie eine wesentlich schnellere Aufnahme der Spektren, was bei gleicher Messzeit eine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit aufgrund des verbesserten Signal/Rausch-Verhältnisses bedeutet.

Die ersten kommerziellen NMR-Impulsspektrometer wurden schon am Anfang der 1960er Jahre in Deutschland von der Firma BRUKER in Karlsruhe gebaut. Diese Firma produzierte auch die ersten erfolgreichen kommerziellen FT-NMR-Spektrometer.

Neben der Entwicklung besserer Messtechniken und NMR-Experimente verbesserte sich zusehends auch die Leistungsfähigkeit der Spektrometer hinsichtlich der Stärke ihres Magnetfeldes. Da es sich laut Gleichung 4 bei  $\hbar$  und  $\gamma$  um eine Kernkonstante handelt, ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen  $\Delta E$  und  $B_0$ . Folglich führt ein größeres  $B_0$ , i.e. höhere Resonanzfrequenz, zu einer stärkeren Aufspaltung der Energieniveaus und damit letztendlich zu besser aufgelösten NMR-Spektren.

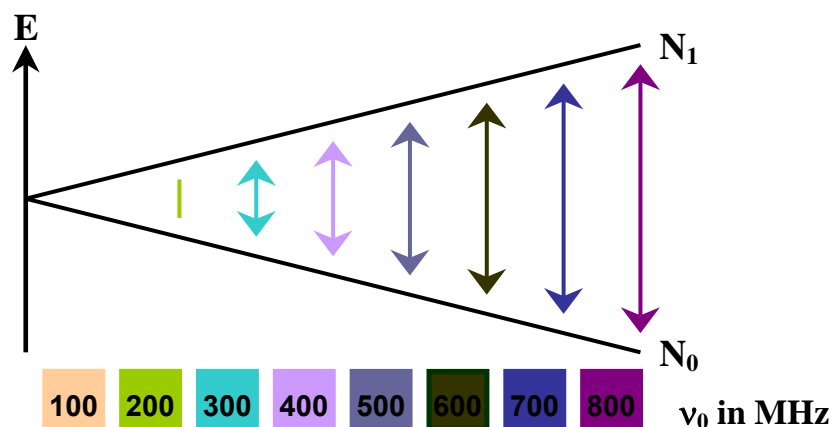


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen  $\Delta E$  und  $B_0$  bzw.  $\nu_0$ . Je größer das Magnetfeld  $B_0$  des Spektrometers, desto besser ist die Aufspaltung der Energieniveaus und damit die Auflösung der Signale in den Spektren.

Während man sich Mitte der 90er Jahre noch mit der Leistung von 600 MHz-Spektrometern begnügen musste, kann man heute, erst 10 Jahre später, auf leistungsstarke 900 MHz-Spektrometer zurückgreifen. Diese technischen Fortschritte auf dem Gebiet der Kernresonanz-Spektroskopie, im Hinblick auf die Entwicklung stärkerer Magnetfelder, größere Datenspeicherungs- und Rechnerkapazitäten und vor allem der immer besseren Mess- und Auswerteverfahren führen dazu, dass die Grenzen der Machbarkeit in der Strukturaufklärung von Proteinen ständig neu definiert werden können.

Allen Entwicklungen voraus legte erst die Einführung der FT-NMR den Grundstein für die Strukturaufklärung von Proteinen. Bei der gepulsten FT-NMR-Spektroskopie werden alle Kerne gleichzeitig durch einen sehr kurzen Radiofrequenzpuls angeregt. Nach dem Puls emittieren alle angeregten Kerne gleichzeitig die während des Pulses aufgenommene Radiostrahlung, d.h. das emittierte Signal ist eine Überlagerung aller Frequenzen, die während des Pulses angeregt wurden. Dieses Signal wird nicht frequenzabhängig registriert, sondern direkt in seiner zeitlichen Entwicklung aufgenommen. Die Emissionsintensitäten der einzelnen Frequenzen, die in ihrer Überlagerung das beobachtete Signal ergeben, erhält

man durch die Fourier-Transformation, durch die die Zeitdaten in eine Frequenzdomäne übersetzt werden. Mit der darauffolgenden Entwicklung zweidimensionaler [Jee71] und spezieller homo- und heteronuklearer Aufnahmetechniken war die methodische Grundlage für die hochauflösende Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie [Ern87] geschaffen. Kurt Wüthrich (Nobelpreis in Chemie 2002) und viele andere bauten diese 2D- und Multi-Dimensions-NMR zu einer mächtigen Analysetechnik der Biochemie insbesondere zur Strukturanalyse von biologischen Makromolekülen und Proteinen aus. Mittlerweile ist die Aufnahme von drei- und vierdimensionalen Spektren zum Standard für die Strukturaufklärung geworden [Gri88, Kay90]. Diese experimentellen Methoden bieten den Vorteil, Signale besser zu separieren und einen höheren Informationsgehalt für jedes Signal erreichen zu können.

Die Größe der untersuchten Proteine ist eine der gravierendsten Einschränkungen für die NMR. In den Spektren großer Moleküle kommt es häufig zu Signalüberlagerungen, welche die Zuordnung eines einzelnen Signals oft unmöglich macht. Zudem nimmt mit zunehmender Molekülmasse die Rotationsdiffusion innerhalb der Lösung ab. Dadurch relaxiert die transversale Magnetisierung schneller (die  $T_2$ -Relaxation wird von  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Wechselwirkungen ausgelöst), was zur Verbreiterung und Abschwächung der detektierten Signale führt. Man kann durch selektive oder vollständige Deuterierung der nicht austauschenden Wasserstoffatome und Rückaustausch der austauschenden Wasserstoffatome (z.B. dem Amid-Proton) die Relaxation sehr stark unterdrücken. Durch Austausch benachbarter Protonen mit Deuterium, welche durch ihre Wechselwirkung die Relaxation stark beeinflussen, lässt sich diese verlangsamen. Letztlich lässt sich durch die Methode, die Protonen großer Proteine mit Deuterium auszutauschen, die Linienbreite verringern und dadurch eine höhere Signaldispersion erreichen. Drastisch verkürzt wird die transversale Relaxation bei der Transversal-Relaxations-optimierten Spektroskopie (TROSY). Durch die Interferenz zwischen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und der Anisotropie der chemischen Verschiebung entsteht die kreuzkorrelierte Relaxation, welche auf verschiedene transversale Relaxationsraten innerhalb der einzelnen Multiplettkomponenten zurückzuführen ist. Bei Protonenfrequenzen nahe 1 GHz verschwindet die transversale Relaxation für eines der vier Multipletts nahezu vollständig. Mit Hilfe der TROSY-Technik wird ausschließlich dieses eine Multiplett aufgenommen, wodurch eine deutliche Verringerung der Linienbreite erreicht wird [Sal99]. Durch die Verwendung neuer Phasenzyklen und entsprechender Datenverarbeitungsprogramme konnte die Empfindlichkeit des TROSY-Experiments um den Faktor  $\sqrt{2}$  erhöht werden.

Die Deuterierung von Protonen und die verschiedenen Varianten von TROSY-Experimenten ermöglichen mittlerweile die NMR-Spektroskopie an größeren Systemen. Unter Einsatz dieser beiden Methoden liegt der Rekord einer NMR-Zuordnung bei dem Molekülkomplex zwischen dem Chaperon GroEL ( $M_r = 800\text{K}$ ) und GROES ( $M_r = 72\text{K}$ ) [Fiau02].

Neben dem Einsatz von immer stärkeren Magneten trieb auch die Entwicklung von leistungsfähigeren Probenköpfen zur Detektion der emittierten Strahlung angeregter Kerne den technischen Fortschritt in der NMR-Spektroskopie voran. Mit den sogenannten Kryoprobenköpfen, die die Empfängerspulen und den Vorverstärker bis auf 20 Kelvin kühlen,



kann das thermische Rauschen der Elektronik so verringert werden, dass sich das Signal-Rausch-Verhältnis um einen Faktor von 4 oder mehr verbessern lässt.

Die Datenanalyse ist momentan der zeitlimitierende Faktor bei der Entschlüsselung neuer Strukturen. Der Erfolg der NMR-Datenauswertung ist abhängig von der Größe des untersuchten Proteins und der Güte der aufgenommenen NMR-Spektren. Die Aufklärung einer Proteinstruktur kann sich daher über mehrere Jahre hinziehen. In dieser Arbeit wurden für weitere strukturelle Untersuchungen (Komplexstrukturberechnungen) die Strukturen der Ras-Bindedomäne von AF6 aufgeklärt und die NMR-Struktur der RBD von Byr2 wesentlich verbessert. Gelingt es, eine solche Molekülstruktur von hoher atomarer Auflösung zu erzeugen, lassen sich deren Wechselwirkungen mit ihrem natürlichen Interaktionspartner durch Molekülkomplexsimulationsrechnungen ableiten. Die hieraus abgeleiteten Informationen können im Rahmen der pharmakologischen Wirkstoffentwicklung ("drug design") von großem Nutzen sein, da dies die gezielte Suche nach Liganden, die am Zielmolekül binden und Interaktionen mit dessen Bindungspartnern beeinflussen können, ermöglicht.

## 3. Methoden und Experimente

### 3.1. Strukturaufklärung von AF6-RBD und Byr2-RBD

#### 3.1.1. Distanzbeschränkungen

Der überwiegende Teil von Informationen, die zur Berechnung einer definierten NMR-Struktur führen, stammt aus den Abstandsbeschränkungen, die aus NOESY-Spektren gewonnen werden. Das NOESY-Experiment (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*) basiert auf der dipolaren Wechselwirkung der Kernspins durch den Raum, dem *Nuclear Overhauser Effect* (NOE) [Ove53]. Die Intensität des NOE-Signals ( $I_{AB}$ ) ist dabei proportional zum Abstand der beteiligten Kerne ( $r$ ).

$$I_{AB} \approx r_{AB}^{-6}$$

Gleichung 6

Räumlich benachbarte Protonenpaare liefern demnach in einem NOESY-Spektrum nur dann ein Kreuzsignal (NOE), wenn die Kerne weniger als 5 Å voneinander entfernt sind. Diese Tatsache erschließt Informationen über die Tertiärstruktur des untersuchten Proteins: Aminosäuren, die sequentiell weit auseinanderliegen, sich aber aufgrund der Faltung des Proteins innerhalb des NOE-Abstandslimits befinden, können im NOESY-Spektrum gesehen werden und tragen so zur Bestimmung und Definition der dreidimensionalen NMR-Struktur bei. Die Möglichkeit, über NOE-Experimente einen räumlichen Bezug zweier Kerne herzustellen, stellt in der NMR-Spektroskopie von Proteinen eine der wichtigsten Strukturinformationen dar.

Für die Strukturaufklärung von AF6 wurden NOE-Daten aus zwei bereits vorhandenen Spektren herangezogen: ein homonukleares 2D-NOESY-Spektrum gemessen in H<sub>2</sub>O, sowie ein heteronukleares <sup>15</sup>N NOESY-HSQC-Spektrum gemessen in H<sub>2</sub>O. Die Verbesserung der Struktur von Byr2 erfolgte ausschließlich über ein homonukleares 2D NOESY-Spektrum, das in dieser Arbeit zugeordnet wurde. Die vielen NOE-Signale aller drei verwendeten Spektren wurden zuerst mit der Software AUREMOL [AUR04] durch eine automatische Peakpicking-Funktion analysiert, die auf Grundlage einer wahrscheinlichen

theoretischen Berechnung durch das Bayes'sche Theorem [Cor67, Cor69] unter Benutzung definierter Schwellenwerte in der Lage ist, echte NOE-Signale von störenden Rauschsignalen zu unterscheiden. Signale, deren Zuordnung von vornherein ausgeschlossen wird, wie z.B. Signale die vom in der NMR-Probe enthaltenen Wasser stammen, wurden nach der Peakpicking-Prozedur wieder manuell entfernt. Die Integration der Signale, sowie die Umrechnung der Signalvolumina erfolgte mit der Programm AUREMOL.

### 3.1.2. Dipolare Kopplungen

Da die vollständige Zuordnung aller (gewöhnlich mehrerer tausend) NOESY-Kreuzsignale aufgrund von Signalüberlagerungen bzw. wegen ihrer nicht mehr vom Rauschen zu unterscheidender Signalausprägung sehr langwierig sein kann, versucht man auf globalere Strukturinformationen zurückzugreifen. Hält sich die Zahl der für eine erfolgreiche Strukturrechnung notwendigen Abstandsinformationen aus den NOESY-Experimenten auf einem bescheidenen Niveau, können zusätzliche Informationen wie z.B. Restdipolkopplungen hilfreich sein, da sie die Freiheitsgrade des Proteins zusätzlich einschränken. Die Restdipolkopplung ist eine anisotrope magnetische Wechselwirkung, deren Größe sich in zwei Werten, der axialen Komponente  $D_a^{AB}$  und der rhombischen Komponente  $R$  des molekularen Orientierungstensors widerspiegelt. Aus der Verteilungsfunktion der dipolaren Kopplungen kann der molekulare Orientierungstensor abgeschätzt werden. Die Beschränkungen aus den dipolaren Kopplungen wurden bei der Strukturrechnung von Byr2 mit einem Wert von 0,3 für die Rhombizität verwendet.

### 3.1.3. Einschränkungen für Diederwinkel

Die Diederwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  legen die Konformation des Protein-Rückgrats fest (Abbildung 15) und haben somit entscheidenden Einfluß auf die Proteinsekundär- und -tertiärstruktur. Je nach Strukturelement nehmen diese Winkel dabei charakteristische Werte an. Wegen sterischer Abstoßung der Seitenketten können diese Winkel außerdem nur in bestimmten Bereichen liegen. Aus diesem Winkelraum lassen sich Winkelbeschränkungen für die Strukturrechnung gewinnen, welche sich mit dem Programm TALOS [Cor99] durch die Analyse der chemischen Verschiebungen von Protonen, Stickstoff- und Kohlenstoffatomen berechnen lassen. Einschränkungen für Diederwinkel waren Bestandteil der Strukturrechnung von Byr2 und AF6.

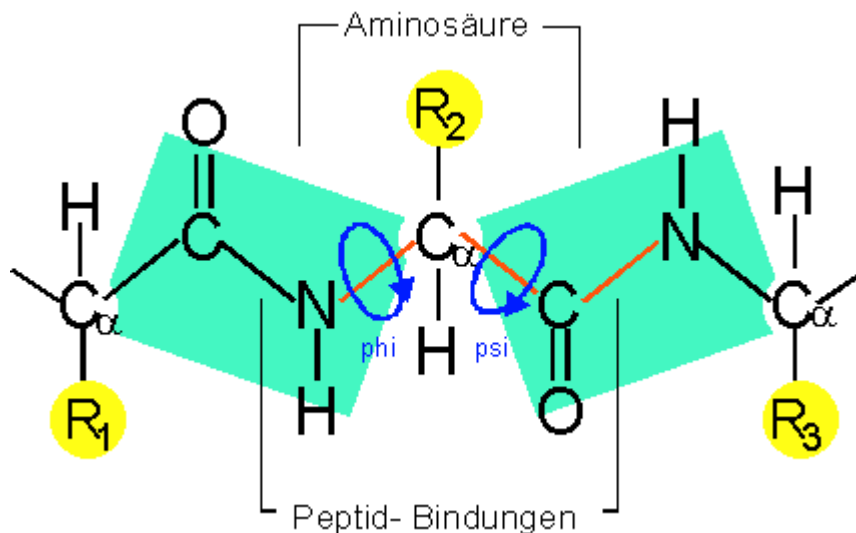


Abbildung 15: Sterische Beschränkungen der Bindungswinkel in einer Peptidkette. Jede Aminosäure trägt drei Bindungen (rot) zu einer Polypeptidkette bei. Die C=O-, C-N- und H-N-Bindungen sind eben und erlauben keine Drehung. Drehungen können nur um die C $_{\alpha}$ -C- und um die N-C $_{\alpha}$ -Bindung stattfinden. R bezeichnet eine AS-Seitenkette. Nach Alberts [Alb97].

### 3.1.4. Strukturrechnung mit CNS

Allgemein formuliert dient die computergestützte Strukturrechnung der Umsetzung der durch die Auswertung der NMR-Spektren gewonnenen Abstands- und Torsionswinkeldaten in eine sichtbare Struktur. Diese aus experimentellen Untersuchungen gewonnenen Informationen, die Einschränkungen des möglichen Konformationsraumes darstellen, reichen jedoch als einzige Eingabedaten nicht aus, um eine Proteinstruktur zu charakterisieren. Die Struktur eines großen Moleküls kann erst dann hinreichend bestimmt werden, wenn zusätzlich empirische Kenntnisse über Bindungslängen kovalent verbundener Atome, Bindungswinkel, Orientierungen, elektrostatische Potentiale, van-der-Waals-Wechselwirkungen und andere strukturrelevante Parameter in die Strukturrechnung einbezogen werden. Die Strukturrechnung liefert als Ergebnis ein Ensemble von Strukturen, das dahingehend überprüft wird, wie gut es sich mit den empirisch fundierten Einschränkungen vereinbaren lässt. Eine gute Proteinstruktur sollte in einem Ensemble von Strukturen hinreichend gut konvergieren und vor allem die experimentellen Daten möglichst vollständig erklären.

Das verwendete Programm CNS 1.1 [Bru98] erlaubt die flexible Festlegung von Rechenprotokollen durch Steuerdateien. Zur Simulation benötigt man eine Anfangsstruktur, die aus allen vorhandenen Informationen über die Molekularstruktur, wie Bindungslängen und Bindungswinkel, generiert wird. Diese Anfangsstruktur kann sowohl ein ausgestreckter Strang ("extended strand") oder eine bereits gefaltete Kette sein.

Ausgehend davon simuliert das Programm die thermische Dynamik der einzelnen Atome und Atomgruppen unter Berücksichtigung der experimentellen Einschränkungen. Basis für diese Moleküldynamiksimulation ist die Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen.

Vor Beginn des Ersten Simulationsschrittes werden allen Atomen der Startstruktur zufällig gewählte Anfangsgeschwindigkeiten aus einer der Temperatur entsprechenden Maxwellverteilung zugeordnet. Während der Simulation werden in vordefinierten Zeitintervallen (z.B. 0,001- 0,005 ps) die Positionen der Atome berechnet.

In diese Rechnungen gehen sowohl die Startpositionen als auch die mittleren, durch die Maxwell- Verteilung bei einer bestimmten Temperatur gegebenen Geschwindigkeiten ein,

$$F_K(t) = m_K a_K(t) = -grad_K E(r(t))$$

#### Gleichung 7

wobei  $F_K(t)$  die Kraft auf Teilchen k zum Zeitpunkt t bezeichnet,  $m_K$  die Masse dieses Teilchens und  $a_K$  seine Beschleunigung.

Außerdem enthalten die Rechnungen auch die Beschleunigungen, welche man aus den Newtonschen Bewegungsgleichungen für die angenommenen Kraftfelder ("force fields") erhält, unter deren Einfluss sich die Struktur entwickelt. Das typische molekulare Kraftfeld oder effektive Potential eines solchen Systems lässt sich in empirische und effektive Energieterme trennen [Bru92]:

$$E = E_{emp} + E_{eff} = (E_{Bind} + E_{Winkel} + E_{Diederw} + E_{ungDie} + E_{Ladung}) + (E_{NOE} + E_{Tors})$$

#### Gleichung 8

$E_{emp}$  beinhaltet die ganze Information über die Primärstruktur des Proteins, sowie die Daten über die Topologie und Bindungen des Proteins allgemein. Die Beiträge der kovalenten Bindungen, der Bindungswinkel und der Diederwinkel bezüglich  $E_{emp}$  werden näherungsweise durch eine harmonische Funktion beschrieben. Im Gegensatz dazu werden die nicht-kovalenten van-der-Waals-Kräfte und die elektrostatischen Wechselwirkungen durch ein Lennard-Jones- oder Coulomb- Potential simuliert.  $E_{eff}$  berücksichtigt die experimentell gefundenen Abstände. Die Winkelzuordnungen und Winkelbeschränkungen werden analog zu den Diederwinkeln durch eine harmonische Funktion angenähert, während  $E_{NOE}$  für solche Entfernungen dann Null ist, wenn sie mit den experimentell gefundenen Werten übereinstimmen. Auch hierfür werden im allgemeinen harmonische Potentiale zugrunde gelegt.

Ziel der Strukturrechnung ist es, eine Konformation des Proteins zu finden, die dem globalen Minimum auf der Energie- Hyperfläche möglichst nahe kommt. Das simulated annealing

Verfahren definiert dazu die „effektive Temperatur“  $T$  des Systems. Dieser Parameter entspricht nicht der physikalischen Temperatur, sondern bestimmt die Größe der zu überwindenden Potentialbarrieren. Anfangs wird  $T$  auf einen hohen Wert gesetzt (50000 K), so dass der Konformationsraum möglichst gleichmäßig abgesucht wird. Im Verlauf der Rechnung senkt man die Temperatur immer weiter ab und erhöht gleichzeitig die Gewichtung der Potentialfaktoren. Auf diese Weise wird der zugängliche Raum immer mehr eingeschränkt, und das System konvergiert im günstigsten Falle stets gegen eine ähnliche Endstruktur.

Das Resultat der Simulation ist eine energieminierte Proteinstruktur. Dabei kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass statt des globalen nur ein lokales Minimum erreicht wird. Deshalb werden in dieser Arbeit 1000 Strukturen mit zufälligen Anfangsgeschwindigkeiten der Atome berechnet, die dann ihre Endstruktur auf verschiedenen Wegen erreichen.

Die folgende Aufstellung gibt eine Übersicht über die maßgeblichen Parameter des verwendeten Annealing-Protokolls in CNS zur Berechnung der Strukturen von Byr2 und AF6.

#### **Parameter für die Hochtemperaturphase**

Methode:	torsion angle dynamics
Temperatur:	50000 K
Schritte:	1000
Zeitschritt:	0,015 ps
Kraftkonstante für NOE-Energierterm:	$150 \text{ kJmol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$
Kraftkonstante für Energierterm und der Diederwinkel:	$100 \text{ kJmol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$

#### **Parameter für die erste langsame Abkühlungsphase**

Methode:	torsion angle dynamics
Temperatur:	50000 K
Schritte:	1000
Zeitschritt:	0,015 ps
Temperaturschritt für die Abkühlung	250 K
Kraftkonstante für NOE-Energierterm:	$150 \text{ kJmol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$
Kraftkonstante für Energierterm und der Diederwinkel:	$200 \text{ kJmol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$

#### **Parameter für die zweite langsame Abkühlungsphase**

Methode:	Cartesian dynamics
Temperatur:	3000 K
Schritte:	3000
Zeitschritt:	0,005 ps
Temperaturschritt für die Abkühlung:	25 K
Kraftkonstante für NOE-Energierterm:	$150 \text{ kJmol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$

Kraftkonstante für Energieterm und der Diederwinkel:	200 kJmol <sup>-1</sup> Å <sup>-2</sup>
<b>Parameter für die abschließende Energieminimierung</b>	
Methode:	Powell
Schritte:	200
Minimierungszyklen:	10
Kraftkonstante für NOE-Energieterm:	75 kJmol <sup>-1</sup> Å <sup>-2</sup>
Kraftkonstante für Energieterm und der Diederwinkel:	400 kJmol <sup>-1</sup> Å <sup>-2</sup>

Um die Energien einzelner berechneter Strukturen zu quantifizieren, verwendet die Software CNS empirische Funktionen, welche wie physikalische Potentiale wirken. Damit werden die Beiträge der unterschiedlichen Wechselwirkungen modelliert. Für die NOE-Einschränkungen wird ein „soft-square“ Potential herangezogen, dessen „flacher“ Bereich durch die vorgegebenen Distanzen und deren Fehlergrenzen bestimmt ist. Zu großen Entfernungen hin wächst das Potential nur linear an, damit einzelne unerfüllbare Einschränkungen (z.B. aus fehlerhaften Zuordnungen) nicht dominant werden.

Aus einem gerechneten Bündel von Strukturen wurden diejenigen mit der geringsten Gesamtenergie herausgesucht. Eine Analyse dieser Strukturen führte meist zur Erweiterung und Korrektur der Restraintlisten, welche wiederum der nächsten Strukturrechnung zugrunde lagen.

### 3.1.5. Strukturverfeinerung im Lösungsmittel Wasser

Die Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie erlaubt die Untersuchung von biologischen Makromolekülen in gelöster Form unter annähernd physiologischen Bedingungen. Bezieht man die Interaktionen des Lösungsmittels durch eine höhere Gewichtung sogenannter "nicht-bindender" Parameter, zum Beispiel schwache NOE-Kontakte mit dem Lösungsmittel in die Strukturrechnung mit ein, führt dies meist zu einer signifikanten Verbesserung der Struktur [Lin99, Xia02], die zudem möglichst nahe an der physiologischen Realität liegt. Eine höhere Gewichtung dieser Parameter in der Strukturverbesserung führt auf diesem Wege zu einer Annäherung der Proteine an ihre natürlichen Bedingungen und zu einer Vorstellung ihrer natürlichen Struktur. Bei herkömmlichen Strukturrechnungsmethoden wie sie im Abschnitt zur Strukturberechnung mit CNS beschrieben wurden, werden diese Parameter im Moleküldynamik-Kraftfeld meist zu Gunsten des Computer-gesteuerten Rechenaufwandes nur gering gewichtet.

Bei der Strukturverfeinerung nach dem Verfahren von Linge und Spronk [Lin03] wird den physiologischen Gegebenheiten Rechnung getragen. Die Verbesserung der Proteinstruktur im Lösungsmittel Wasser erfolgt hierbei durch eine höhere Gewichtung der nicht-bindenden

gegenüber den kovalenten Kraftfeldern bei der Rechnung mit XPLOR-NIH. Die Struktur wird hierbei in einem Hybrid-Kraftfeld basierend auf kovalenten Parametern und zusätzlich modifizierten "nicht-bindenden" Parametern verfeinert [Nab04, Lin03]. Bei diesem Verfahren werden die Strukturen abschließend automatisch mit den Programmen PROCHECK [Las93] und WHATCHECK [Hoo96] analysiert.

Die Datenbasis der Strukturverbesserung von AF6 und Byr2 bilden die zehn energetisch besten Strukturen aus der Strukturrechnung mit CNS 1.1 und die experimentell ermittelten Einschränkungen des Konformationsraumes. Unter Berücksichtigung der Einschränkungen werden die zehn besten Strukturen bei entsprechender Gewichtung der Kraftfelder mit dem Programm XPLOR-NIH verfeinert. Man erhält nach Linge und Spronk neben den verfeinerten zehn Strukturen zusätzlich die Analyse der in die Rechnung eingebrachten und verbesserten Strukturen. Anhand dieser Analysen ist es möglich, die Strukturverbesserung zu quantifizieren, da aufgrund der unterschiedlichen Kraftfeld-Gewichtungen bei der ursprünglichen Strukturrechnung und der Strukturverbesserung in explizit Wasser ein direkter Vergleich der Qualitätswerte einer Struktur, wie zum Beispiel die Energien, nicht möglich ist.

### 3.1.6. Beurteilung von Strukturen

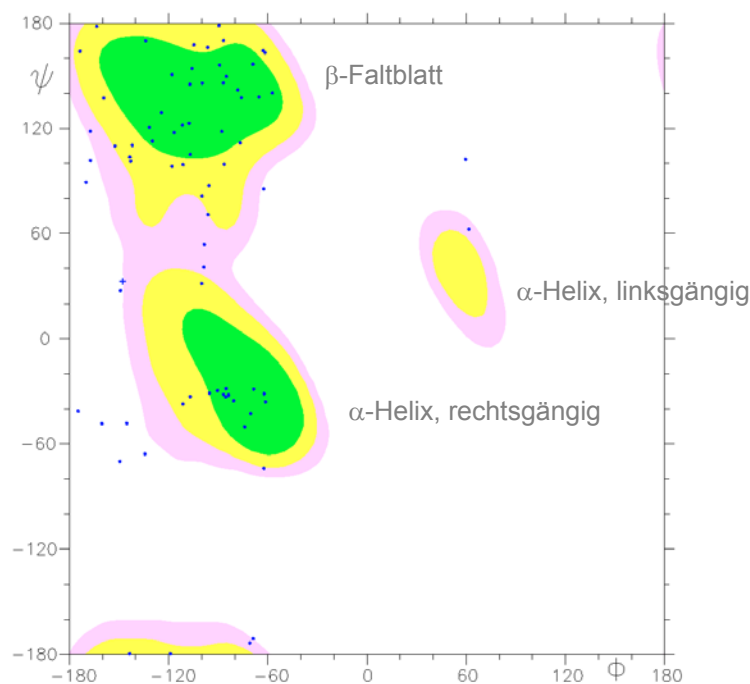
Bei der Betrachtung einer Molekülstruktur muss man sich bewußt sein, dass man keinen Blick auf ein wirklich existierendes Molekül wirft, sondern dass diese Struktur nur eine Modellvorstellung resultierend aus diversen Experimenten, Messungen und Computersimulationen ist. Die Beurteilung und Bewertung derart errechneter Strukturen ist schwierig. Ein Makromolekül ist dynamischen Prozessen unterworfen und stellt daher kein starres Gebilde dar. Eine auf NMR-Daten basierende und errechnete Struktur ist generell nur eine "Momentaufnahme" dieses komplexen dynamischen Systems. Demnach existiert auch kein einzelner Parameter, der eindeutige Aussagen über die "Richtigkeit" von NMR-Strukturen gibt. Um diese zu bewerten, ist es vielmehr nötig, verschiedene Parameter auf ihre Stimmigkeit und Konvergenz zu überprüfen. Betrachtet man diese Werte in der Gesamtheit der Strukturbeurteilung, erhält man einen Eindruck von der Qualität der vorliegenden Struktur.

Einer dieser Beurteilungsparameter für die Güte einer errechneten Struktur sind die Energiewerte, welche von dem hier eingesetzten Moleküldynamikprogramm CNS für jede gerechnete Struktur dokumentiert werden. Die Auswahl der zehn besten Strukturen aus einem gerechneten Strukturbündel (meist 1000 Strukturen) erfolgte stets nach der Gesamtenergie, welche sich wiederum aus Einzelbeiträgen von unterschiedlichen Arten von Verletzungsenergien zusammensetzt. So führt in der Strukturrechnung eine Verletzung einer Distanzbeschränkung zur Erhöhung der zugehörigen NOE-Energie. Werden dagegen feststehende Bindungsgeometrien des Proteinrückgrats verletzt, führt dies zu einer Belegung der entsprechenden Energien zur Beschreibung der Winkelräume mit entsprechenden



Pseudoenergien. So kann zum einen der Wert der Gesamtenergien errechneter Strukturen als Auswahlkriterium der besten Strukturen aus einem Ensemble von vielen Strukturen herangezogen werden und zum anderen können die Einzelbeiträge der einzelnen Energiearten zur Überprüfung der experimentell ermittelten und für die Strukturrechnung eingesetzten Beschränkungen genutzt werden. Ist eine Vorgabe für die Moleküldynamikrechnung mit einer auffällig hohen Verletzungsenergie belegt worden, kann diese vor einer erneuten Strukturrechnung im Hinblick auf ihre Konsistenz hinterfragt und gegebenenfalls berichtigt werden.

Sind die Einschränkungen bestmöglichst erfüllt, liegen auch die Diederwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  in den zu erwartenden bevorzugten Kombinationsbereichen. Die Verteilung der Lage der Diederwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  im Ramachandran-Plot ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung von Strukturen. In einem Ramachandran-Diagramm werden die Hauptkettenwinkel eines Proteins aufgetragen. Das aufgetragene Paar aus dem Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  einer einzelnen Aminosäure ist streng durch sterische Behinderungen beschränkt. Die erlaubten Kombinationen sind gefärbt eingezeichnet (siehe Abbildung 16). Jeder Punkt auf dem Diagramm, das erstellt wird, repräsentiert die beiden Diederwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  auf jeder Seite des  $C\alpha$ -Atoms einer Aminosäure. Ramachandran-Plots sind eine große Hilfe, unrealistische Regionen im Strukturmodell zu finden.



*Abbildung 16: Beispiel für einen Ramachandran-Plot. Es zeigt die theoretisch erlaubten Winkelkombinationen für bestimmte Sekundärstrukturelemente.*

Ein weiteres Bewertungskriterium zur Beurteilung der Güte von Proteinstrukturen, das in dieser Arbeit zum Einsatz kam, war die RMSD-Wert-Analyse. Die RMSD-Werte zur mittleren

Struktur geben ein Maß dafür, wie sehr die Position jedes Atoms einer Struktur in einem gegebenen Bündel variiert. Der RMSD-Wert für ein Molekül trifft eine Aussage darüber, wie sehr die einzelnen Atome eines gegebenen Bündels von der berechneten mittleren Struktur abweichen.

Ein weiteres Qualitätsmaß, das für die Beurteilung der in dieser Arbeit verbesserten Strukturen Anwendung fand, wird seit längerem schon in der zur NMR wichtigsten Konkurrenzmethode, der Röntgenkristallographie eingesetzt. Der sogenannte kristallographische R-Faktor vergleicht experimentelle und rückgerechnete Spektren. Der R-Faktor ist hierbei die mittlere Abweichung der aus der Struktur zurückgerechneten Reflexintensitäten von den gemessenen [Bru87].

In früheren Arbeiten wurde für die NMR ein vergleichbarer Qualitätsfaktor eingeführt (RFAC, [Gro00]), der ebenfalls in dieser Arbeit als ein wichtiges Qualitätsmerkmal Verwendung fand. Dabei wird ein benanntes experimentelles NMR-Spektrum mit dem zurückgerechneten Spektrum aus einer bestimmten Strukturvorstellung verglichen. Damit können sowohl globale R-Werte für die ganze Struktur als auch R-Werte für bestimmte Teile (z.B. Sekundärstrukturelemente) oder für unterschiedliche Distanzklassen (long-range, short-range NOEs) berechnet werden. Diese R-Faktoren geben dann Aufschluss darüber, wie gut die jeweilige Strukturvorstellung mit den tatsächlichen experimentellen Daten übereinstimmt.

Nur die Gesamtheit all dieser unterschiedlichen Bewertungskriterien ermöglichen eine detaillierte Beurteilung experimentell und rechnerisch ermittelter Strukturvorstellungen großer Moleküle.

## 3.2. Modelle der Komplexstrukturen

### 3.2.1. Bestimmung der AF6-Bindungsfläche für Rap1A und H-Ras

Durch die Bindung eines Interaktionspartners an ein Protein ändert sich die chemische Umgebung der von der Bindung betroffenen Kerne und damit deren kernmagnetische Resonanz. Anhand der Änderungen der Resonanzen können die an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren identifiziert werden. Aus diesen läßt sich dann die Bindungsfläche des untersuchten Proteins festlegen.

Zur Identifizierung der AF6-Bindungsfläche für Rap1A und H-Ras wurden von Guido Steiner in einer Titrationsreihe sowohl vom AF6•H-RAS-Komplex als auch vom AF6•Rap1A-Komplex  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Experimente mit zunehmenden Rap1A- oder H-Ras-Konzentrationen gemessen. Die Informationen, welche Konzentrationen verwendet wurden und wie die Proben aufbereitet wurden, sind der Dissertation von Guido Steiner [Ste01] zu entnehmen.

### 3.2.2. Strukturmodell von H-Ras

Für die Berechnung der Komplexstruktur von AF6 mit H-Ras wurde die H-Ras-Variante aus der Röntgenstruktur des Komplexes zwischen Byr2-RBD und H-Ras (PDB-ID in der Protein-Datenbank: 1K8R) [Sche01] verwendet. Dabei handelt es sich um das Gen-Produkt des H-RAS1-Gens aus Homo Sapiens. Das hier eingesetzte Fragment ist eine GTP-bindende, katalytische Domäne, die sich aus 166 Aminosäuren zusammensetzt.

Da Ras-Moleküle nur in ihrer GTP-gebundenen Form bindungsaktiv sind, muss das GTP, welches durch intrinsische Hydrolyse durch die moleküleigene GTPase-Aktivität zu GDP hydrolysiert wird, durch ein GTP-Analogon ersetzt werden. Das für diese Komplex-Studie verwendete H-Ras wurde durch die Bindung des GTP-Analogs Gpp(NH)p in seiner aktiven, bindungsfähigen Form "festgehalten". Die  $\gamma$ -Iminogruppe des Gpp(NH)p verhindert die Hydrolyse (s. Abbildung 17).

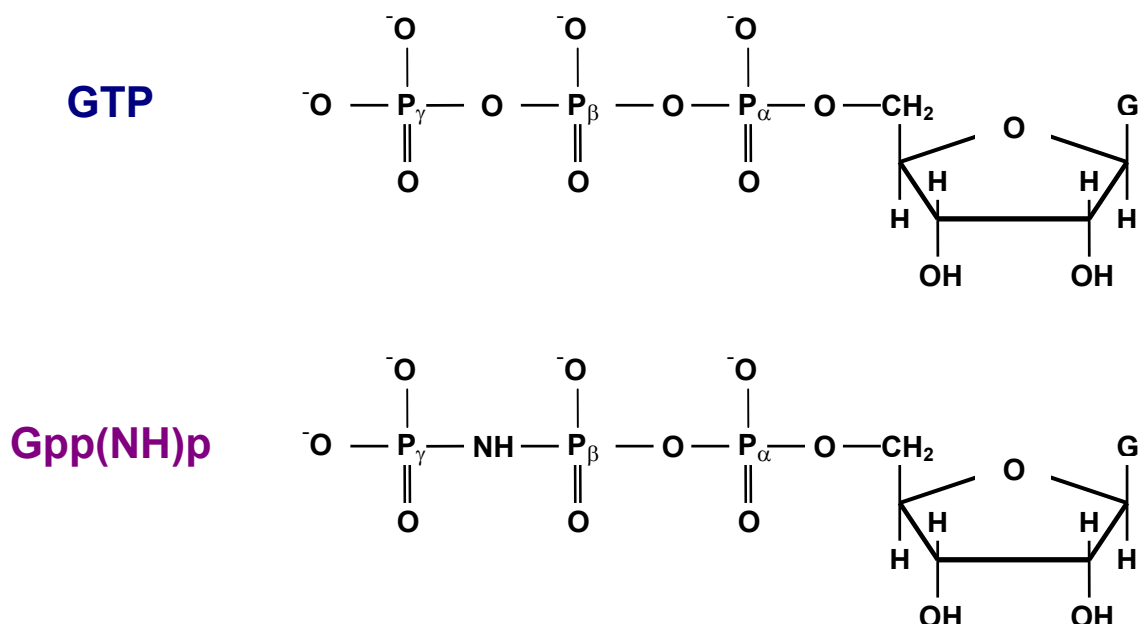


Abbildung 17: Gezeigt ist die Struktur des hydrolysierbaren GTP, welches für die in der Komplexstrukturrechnung verwendeten Röntgenstruktur von H-Ras gegen das nicht-hydrolysierbare Analogon Gpp(NH)p ausgetauscht wurde. **G** bezeichnet das hier nicht dargestellte Guaninnukleotid.

Die Topologiedaten zur Ergänzung der Topologiedateien von CNS für die Berechnung der Komplexstrukturen mussten für das Gpp(NH)p nachträglich erzeugt werden. Dies geschah durch Eingabe der Koordinaten des Gpp(NH)p aus der pdb-Datei in eine vom "Dundee PRODRG2 Server" [DPS] zur Verfügung gestellten Software zur Berechnung der Topologiedateien. Diese wurden anschließend in den beiden Dateien "topallhdg5.3.pro" und "parallhdg.5.3.pro" hinzugefügt.

### 3.2.3. Strukturmodell von Rap1A

Eine dreidimensionale NMR- oder Röntgenkristallstruktur von Rap1A war nicht verfügbar, wohl aber eine Röntgenkristallstruktur des Komplexes der C-Raf1-Kinase mit dem Ras-verwandten Protein Rap1A. Das 167 Aminosäurereste große Rap1A-Fragment, welches aus Homo Sapiens stammt, ist in der verfügbaren Koordinatendatei an ein hydrolysierbares GTP (s. obere Strukturformel der Abbildung 17) gebunden (PDB-ID in der Protein-Datenbank: 1C1Y) [Nas95]. Der C-Raf1•Rap1A-Komplex wurde mit dem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analog Gpp(NH)p kristallisiert und nach Aufklärung der Röntgenkristallstruktur lediglich die Imino-Gruppe des Gpp(NH)p gegen das  $\beta$ ,  $\gamma$ -O in der Koordinatendatei ausgetauscht. Die Topologiedateien des GTPs wurden mit der in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Methode nachträglich dem Moleküldynamikprogramm CNS hinzugefügt.

### 3.2.4. Docking von AF6 mit H-Ras und Rap1A

Die Ras-Bindedomäne von AF6 interagiert sowohl mit H-Ras als auch mit dem Ras-verwandten Molekül Rap1A. Der Ras-Effektor AF6 wurde in dieser Arbeit strukturell untersucht, um so mit weiterführenden Moleküldynamiksimulationen einen detaillierten Einblick in den Wechselwirkungsmechanismus des Moleküls mit seinen beiden Interaktionspartnern zu erhalten. Es bieten sich nur wenige Methoden an, mit denen sich Informationen gewinnen lassen, die bis auf atomares Niveau aufgelöst sind. Beide hochauflösende Methoden, sowohl die Röntgenkristallographie, als auch die NMR stoßen bei der Aufklärung und Analyse von Komplexstrukturen an ihre Grenzen. In der Röntgenkristallographie kann die Dynamik der Komplexbildung die Kristallbildung verhindern, während in der NMR die Größenbeschränkung in Bezug auf das Molekulargewicht der untersuchten Proteine Probleme bereiten kann. Diese Hindernisse in der Aufklärung von Komplexstrukturen machen sich in der Tatsache bemerkbar, dass lediglich ein geringer Prozentsatz von Protein-komplexstrukturen im Vergleich zur Anzahl bisher aufgeklärter Einzelstrukturen in der PDB-Datenbank zu finden ist.

Das Moleküldynamikprogramm HADDOCK (*High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing*) kann unter Berücksichtigung biochemischer und biophysikalischer Daten ein Strukturmodell eines Protein-Protein-Komplexes berechnen [Dom03]. HADDOCK basiert auf einer *informationsgesteuerten, flexiblen Docking Methode*, die sich zum einen auf experimentell ermittelte Daten bezieht und zum anderen flexible Proteinbereiche und damit auch kleinere Konformationsänderungen bei der Strukturvorhersage berücksichtigt.

HADDOCK benötigt für die Berechnung einer Komplexstruktur die dreidimensionalen Strukturen der beiden Interaktionspartner und die Kenntnis der jeweiligen Bindungsflächen der Proteine. Zur Definition der Bindungsflächen beider Interaktionspartner dienen Informationen wie z. B. die Änderungen der chemischen Verschiebungen oder des Volumens eines NMR-Signals, die Oberflächenzugänglichkeit für Lösungsmittel einer für eine Wechselwirkung in Frage kommenden Aminosäure, ebenso wie Kopplungsdaten oder

Daten aus Mutageneseexperimenten. Aufgrund dieser Informationen können die Bindungsflächen für eine Dockingsimulation mit HADDOCK vordefiniert werden. Zudem läßt dieses Programm eine Unterscheidung der an einer Bindung beteiligten Aminosäure-Reste zu. Sogenannte aktive AIRs (*Ambiguous Interaction Restraint*) sind mehrdeutige Interaktions-einschränkungen beschreiben Aminosäure-Reste, die direkt an der Komplexbildung beteiligt sind, während passive AIRs lediglich an Interaktionen beider Moleküle beteiligt sein können. Als passive AIRs werden meist Aminosäuren definiert, die aktiven AIRs benachbart sind und deren Oberflächenzugänglichkeit relativ hoch ist. AIRs sind somit vieldeutige Distanzeinschränkungen, die einen maximalen Abstand von 2-5 Å zwischen jedem Atom eines als aktiv definierten Rests i von Protein A und jedem Atom von allen aktiven und passiven Resten von Protein B festlegen. HADDOCK stützt sich bei der Berechnung der Komplexstruktur auf die Moleküldynamik-Funktionen des Programms CNS 1.1. Ein an der Interaktion beteiligtes Atom einer Aminosäure darf dabei den maximalen Abstand in der mit CNS berechneten Komplexstruktur nicht überschreiten.

Das Docking der Proteine an den definierten Bindungsflächen durch das Programm HADDOCK erfolgt in drei Schritten. Im ersten Schritt, der als *rigid body minimization* bezeichnet wird, werden möglichst viele Komplexstrukturen gerechnet, in denen die zu dockenden Proteine als starre Körper zufällig zueinander orientiert werden und die Distanzen zwischen den Molekülen unter Energie-Minimierung möglichst gering bleiben. Dieser erste Schritt dient dazu, möglichst viele unbeeinflusste Startstrukturen für das folgende Proteindocking mit flexiblen Proteinbereichen zu erhalten. Im zweiten Schritt folgt die erste Verfeinerung der Komplexstruktur, dem *TAD-SA*, oder dem *semi-flexible simulated annealing in torsion angle space*. In diesem Docking-Protokoll werden ausgehend von den x-besten Strukturen aus der *rigid body minimization* erst die Seitenketten und anschließend zusätzlich die Hauptkette der Bindungsfläche flexibel gehalten, so dass sie sich in der Simulation frei bewegen können. Da jedes Bindungsgeschehen bei den direkt betroffenen und benachbarten Aminosäuren zumindest kleinere konformationelle Änderungen hervorruft, wird mit der in diesem zweiten Docking-Schritt simulierten Flexibilität der Bindungsbereiche den realen Geschehnissen bei der Komplexbildung Rechnung getragen. Im dritten und letzten Schritt der Komplexstrukturenberechnung erfolgt eine Verfeinerung der Komplexstrukturen in einer Wasserhülle (*water refinement*). Anschließend werden die Komplexstrukturen von HADDOCK automatisch durch verschiedene zugeschaltete Softwarepakete wie z.B. PROCHECK oder WHATCHECK analysiert.

Die automatische Analyse beinhaltet die Bewertung der erhaltenen, in Wasser verfeinerten Strukturen nach Energien in kcal/mol. Die totale Energie ( $E_{total}$ ) des Strukturmodells ergibt sich aus der Summe der totalen inter- und intramolekularen Energien

$$E_{total} = E_{bond} + E_{angle} + E_{imp} + E_{dihed} + E_{vdw} + E_{elec}$$

Gleichung 9

wobei für die totale inter- und intramolekularen Protein-Protein Energien gilt

$$E_{total}^{inter} = E_{vdw} + E_{elec}$$

Gleichung 10

$$E_{total}^{intra} = E_{bond} + E_{angle} + E_{imp} + E_{dihed}$$

Gleichung 11

Die Berechnung der Strukturmodelle der beiden Komplexe AF6•H-Ras und AF6•Rap1A basierten auf der experimentellen Lösungsstruktur von AF6-RBD und den Röntgenkristallstrukturen von H-Ras (aus dem Komplex mit Byr2-RBD) und Rap1A (aus dem Komplex mit der C-Raf1-Kinase). Der maximale Wert der AIRs wurde auf 2 Å festgelegt. In den beiden vorgestellten Rechnungen wurden bei AF6-RBD die an der H-Ras- und Rap1A-Bindung beteiligten Aminosäuren als aktive AIRs und die räumlich benachbarten Aminosäuren mit einer großen Oberflächenzugänglichkeit als passive AIRs definiert. Sowohl bei H-Ras als auch bei Rap1A ist bis dato nicht bekannt, welche Aminosäuren tatsächlich an der Bindung mit AF6 beteiligt sind. Die Definition der Bindungsstellen dieser beiden Moleküle für AF6 wurde anhand von Komplexstrukturen anderer Effektoren mit ihrem Ras-Molekül abgeleitet. Für die Rechenparameter wurden überwiegend die Default-Einstellungen übernommen. Im ersten Schritt der Modellberechnung wurden 800 Strukturen bestimmt. Die 100 energetisch besten Strukturen aus diesem ersten Rechenschritt wurden im zweiten Schritt, dem *TAD-SA*, verbessert. Abschließend erfolgte eine Verfeinerung der 100 Strukturmodelle im Lösungsmittel Wasser und eine Analyse der erhaltenen Komplexstrukturen.

Wichtigster Bestandteil der Analyse der Dockingresultate ist die sogenannte Cluster-Analyse, die von Haddock automatisch oder auch nachträglich zur genaueren Analyse mit variierenden Parametern mit dem Skript *cluster\_struct* an den gerechneten Komplexstrukturen nachvollzogen werden kann. In der Clusteranalyse wird geprüft, ob ein Molekül A bei der Komplexbildung am Molekül B eine bestimmte Vorzugsrichtung einnimmt, die so gehäuft auftritt, dass sich bei den ermittelten Komplexstrukturen Cluster einer oder mehrerer Orientierungen der gedockten Moleküle zueinander festlegen lassen. Die Cluster-Analyse durch Haddock bezieht sich auf den RMSD-Wert. Dabei werden alle Hauptkettenatome von AF6 paarweise überlagert und der RMSD-Wert für jede mögliche Paarung in AF6 ermittelt. Daraus resultiert eine RMSD-Matrix der Komplexstruktur-Paare, anhand derer Cluster-Bildung festgestellt und die beteiligten Strukturen aufgelistet werden. Ein Cluster war definiert, wenn mindestens vier Komplexstrukturen einen maximalen RMSD-Wert von 1,5 Å aufwiesen.

### 3.3. Sequentielle Zuordnung von Nore1-RBD

#### 3.3.1. Proteinexpression und Isotopenmarkierung

Die Proben der Ras-Bindedomäne von Nore1 wurden von Prof. Dr. Christian Herrmann, Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum bezogen.

Die in dieser Arbeit untersuchte Ras-Bindedomäne von Nore1 besteht aus den Residuen 199-358 im Nore1-Protein und ist somit um eine Aminosäure kürzer als die RBD, wie sie sich aus der biochemischen Analyse der Domänenstruktur von Nore1 ergibt.

														His
200														214
Pro	Pro	Thr	Ile	Gln	Glu	Ile	Lys	Gln	Lys	Ile	Asp	Ser	Tyr	Asn
215														229
Ser	Arg	Glu	Lys	His	Cys	Leu	Gly	Met	Lys	Leu	Ser	Glu	Asp	Gly
230														244
Thr	Tyr	Thr	Gly	Phe	Ile	Lys	Val	His	Leu	Lys	Leu	Arg	Arg	Pro
245														259
Val	Thr	Val	Pro	Ala	Gly	Ile	Arg	Pro	Gln	Ser	Ile	Tyr	Asp	Ala
260														274
Ile	Lys	Glu	Val	Asn	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Asp	Lys	Arg	Thr	Ser
275														289
Phe	Tyr	Leu	Pro	Leu	Asp	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	His	Ile	Ser	Ser
290														304
Thr	Thr	Thr	Val	Ser	Glu	Val	Ile	Gln	Gly	Leu	Leu	Lys	Lys	Phe
305														319
Met	Val	Val	Asp	Asn	Pro	Gln	Lys	Phe	Ala	Leu	Phe	Lys	Arg	Ile
320														334
His	Lys	Asp	Gly	Gln	Val	Leu	Phe	Gln	Lys	Leu	Ser	Ile	Ala	Asp
335														349
Tyr	Pro	Leu	Tyr	Leu	Arg	Leu	Leu	Ala	Gly	Pro	Asp	Thr	Asp	Val
350								358						
Leu	Ser	Phe	Val	Leu	Lys	Glu	Asn	Glu						

Abbildung 18: Primärsequenz von Nore1-RBD. Das Konstrukt bestand aus den Aminosäuren 199 bis 358 des Nore1-Proteins.



Nore1 wurde im E.Coli Stamm BL21 (DE) unter Verwendung des Plasmids pGex4T3 (mit Ampicillin-Resistenzgen der Firma GE Healthcare) synthetisiert. Das Nore-RBD-Konstrukt ist N-terminal mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert und wurde dementsprechend mit Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Nach der Zellernte wurde das Bakterienpellet in Puffer X<sup>2</sup> mit Zusatz von 500 mM NaCl, 1mM DTE und 1mM PMSF resuspendiert und aufgeschlossen. Das Rohlysat wurde durch Zentrifugation auf eine mit Glutathion (GSH)-Sephrose (Amersham Biosciences) befüllte Säule aufgetragen. Nach sorgfältigem Spülen der Säule wurde ein Säulenvolumen GSH-haltiger Puffer (Puffer X + 100 mM NaCl + 20 mM GSH) aufgegeben und das Fusionsprotein nach einstündiger Inkubation mit weiterem GSH-Puffer eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mit Hilfe von Vivaspin-Zentrifugationsröhrchen aufkonzentriert und nach Zusatz von 40 bis 50 U Thrombin pro Liter Kulturmedium über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde per SDS-Page überprüft und der Reaktionsansatz anschließend mit Hilfe eines Gelfiltrationslaufes über eine kleine S75-Säule und einem Pufferwechsel zu GSH-freiem Puffer X (plus 1mM DTE) unterzogen. Die abgespaltene GST wurde über eine weitere GSH-Affinitätschromatographie abgetrennt, der Durchlauf aufkonzentriert und eine abschließende Größenausschlußchromatographie durchgeführt.

Für die Isotopenmarkierung wurde Minimalmedium (M9 + Spurenelementlösung + Ampicillin) verwendet. 1l Medium enthielt zur Herstellung der doppelt markierten Proteinprobe 2g <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Glukose und 1g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl. Die Ausbeute für die doppelt isotopenmarkierte Probe lag bei ca. 1 mg/L. Für die Herstellung einer einfach markierten <sup>15</sup>N-Probe wurden 0,5g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl pro Liter Kulturmedium eingesetzt. Hier lag die Ausbeute bei ca. 2 g/L Kulturmedium.

### 3.3.2. Probenzusammensetzung und Spektrenaufnahme

Die Proben von Nore1-RBD waren in einem Puffer von 20 mM Kalium-Phosphat, 0,5 mM EDTA und 3 mM DTE bei einem pH-Wert von 6,9 gelöst. Zur Herstellung der NMR-Proben wurde 0,2 mM DSS (2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonsäure) als Standard und 100 mM NaN<sub>3</sub>, 100 µM Leupeptin (475 Da), 100 µM Pepstatin (685 Da) und 10 µM BPTI (6,5 kDa) als Protease-Inhibitoren beigelegt. Der voreingestellte pH-Wert wurde nicht verändert. Die Proteinkonzentration in den Proben variierte von 0,4 bis 0,9 mM. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus 95% H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O verwendet. Die Beimengung von mindestens 5% D<sub>2</sub>O ist erforderlich, um mit Hilfe des Deuterium-Locksignals die Homogenität des stationären Feldes sicher zu stellen. Die Proben wurden ausschließlich in 5 mm-Shigemi-Glasröhrchen gemessen, was einem Probenvolumen von 280-400 µl entspricht.

---

<sup>2</sup> Puffer X: 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker DRX600 oder DRX800 Spektrometer aufgenommen. Soweit nicht anders vermerkt, wurde bei einer Temperatur von 298 K gemessen. Die chemische Verschiebung der Protonen wurde auf den internen Standard DSS referenziert. Die Aufnahme der Messungen und die Prozessierung erfolgte mit dem Programm XWINNMR 2.6 (Bruker, Karlsruhe). Die Daten wurden mit dem Programm AUREMOL [Aur04] ausgewertet.

### 3.3.3. NMR-Experimente zur Zuordnung der Resonanzen

Die Zuordnung des Proteinerückgrates über NOESY-HSQC- und TOCSY-HSQC-Spektren ist bei Proteinen > 15 kDa nur mehr bedingt möglich, da zum einen die Überlappung von Signalen im NOESY-HSQC und zum anderen das Fehlen von Signalen im TOCSY-HSQC eine Auswertung dieser Spektren erschweren können. Zur sequentiellen Zuordnung der Resonanzen der Proteinhauptkette kann die Verwendung von Tripelresonanzexperimenten weiterhelfen. Da diese Experimente auf der Korrelation dreier verschiedener Kerne beruhen, werden hierfür doppelt markierte ( $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ )-Proteinproben benötigt. Durch das Einführen einer dritten Dimension werden die Signale entzerrt und Überlappungen zum Teil beseitigt, da sich die Signale auf einem Quader verteilen, dessen einzelne Ebenen nach Spinsystemen durchsucht werden. Folglich verteilen sich alle im Spektrum abgebildeten Spinsysteme in den vielen Ebenen der dritten Dimension.

Für die sequentielle Zuordnung der Resonanzen des Proteinerückgrats der RBD von Nore1 mit einer Molekülmasse von 18,6 kDa wurden folgende zwei- und dreidimensionale Experimente verwendet:

- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC
- TROSY-HNCA
- TROSY-CBCANH
- TROSY-CBCA(CO)NH
- TROSY-HN(CO)CA

Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Messung wurde an einer  $^{15}\text{N}$ -markierten und die drei Tripelresonanz-Experimente HNCA, CBCANH und CBCA(CO)NH an einer  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Nore1-Probe bei 298 K an einem 800 MHz-Spektrometer gemessen.

Für die sequentielle Zuordnung der Spinsysteme des Proteinerückgrats sind die dreidimensionalen Tripelresonanzexperimente entscheidend. Sie stellen eine Verbindung zwischen den Atomen benachbarter Aminosäurereste her. Das einfachste und wichtigste dieser vier Experimente, welches in dieser Arbeit angewendet wurde, stellt das HNCA-Experiment dar. Beim HNCA-Spektrum erhält man, ausgehend vom  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum, in der dritten Dimension zu jedem Hauptkettenamid die  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Resonanz der eigenen Aminosäure und, etwas schwächer die  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Resonanz der sequentiell davor

liegenden Aminosäure. Die Magnetisierung wird dabei vom Amid-Proton auf den skalar koppelnden Stickstoffkern transferiert, von wo sie auf die  $C^\alpha$ -Kerne der vorhergehenden und der eigenen Aminosäure und wieder zurück auf das Amid-Proton übertragen wird. Da die Kopplung zwischen dem  $^{15}\text{N}$ -Kern und dem  $C^\alpha$ -Kern der eigenen Aminosäure mit 11 Hz vergleichsweise größer ist als die Kopplung des  $^{15}\text{N}$ -Kerns mit dem  $C^\alpha$ -Kern der sequentiell vorangehenden Aminosäure (7 Hz), erklärt dies auch die unterschiedliche Intensität der Signale im HNCA-Spektrum für die beiden  $C^\alpha$ -Kerne.

Das HN(CO)CA-Experiment kam zum Einsatz als man feststellte, dass in manchen Spinsystemen des HNCA-Spektrums das  $C^\alpha$ -Signal des Vorgängers nicht sichtbar war, weil es vom darüberliegenden Signal des eigenen  $C^\alpha$ s verdeckt wurde. Im HN(CO)CA-Spektrum erhält man zum Amid-Proton der eigenen Aminosäure das zugehörige  $C^\alpha$ -Signal des Vorgängers, nicht jedoch das  $C^\alpha$ -Signal der eigenen Aminosäure.

Im Idealfall könnte mit diesen beiden Experimenten die Aneinanderreihung aller Spinsysteme in der sequentiellen Reihenfolge des untersuchten Proteins gelingen. Allerdings treten besonders bei großen Proteinen in der Praxis häufig mehrere Möglichkeiten der Zuordnung der Spinsysteme im HNCA-Spektrum auf. Dies liegt daran, dass es für ein  $C^\alpha$  des Vorgängers mehrere Spinsysteme gibt, die für eine Zuordnung in Frage kommen könnten. In diesem Fall können die anderen beiden Tripelresonanzexperimente, das CBCA(CO)NH- und das CBCANH-Experiment, weitere Informationen liefern, die als Ausschlusskriterium bei mehreren Zuordnungsmöglichkeiten angewendet werden. Diese beiden Tripelresonanzexperimente geben neben den  $C^\alpha$ -Resonanzen zusätzlich auch die Resonanzen der zugehörigen  $C^\beta$ -Kerne preis. Im CBCA(CO)NH-Spektrum sieht man auf der Hauptkettenamidfrequenz von Rest  $i$  die  $C^\alpha$ - und  $C^\beta$ -Signale von Aminosäure  $i-1$ . Der Name dieses Experiments spiegelt den Magnetisierungstransfer wider: Eingeklammert ist der CO-Kern, über den die Magnetisierung zwar transferiert wird, auf dem aber keine Entwicklung der Magnetisierung erfolgt. Der Magnetisierungstransfer erfolgt mit der Anregung des  $^1\text{H}$ -Kerns über den  $^{13}\text{C}^\beta$ -Kern des  $(i-1)$ -ten Aminosäurerests auf den  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kern. Von dort wird die Magnetisierung über den  $^{13}\text{C}^\text{O}$ -Kern und den  $^{15}\text{N}$ -Kern auf den  $^1\text{H}^\text{N}$ -Kern übertragen. Anschließend erfolgt die Detektion der Resonanzen.

Eine weitere wichtige Rolle für die Zuordnung des Proteinrückgrats spielt das CBCANH-Experiment. Aus dem Spektrum dieses Experimentes erhält man die  $C^\beta$ - und die  $C^\alpha$ -Signale der eigenen und der vorhergehenden Aminosäure in der Proteinsequenz. Kombiniert man die Informationen aus dem CBCA(CO)NH-Spektrum mit denen aus dem CBCANH-Spektrum, kann man aufgrund der bis zu diesem Punkt bekannten  $C^\alpha(i)$ ,  $C^\alpha(i-1)$  und des  $C^\beta(i-1)$  auf das  $C^\beta$  der eigenen Aminosäure ( $C^\beta(i)$ ) schließen. Allerdings ist dieses Experiment bei Proteinen  $> 15$  kDa nicht mehr sehr sensitiv, so dass ein Großteil der in diesem Spektrum enthaltenen Signale nicht mehr hinreichend vom Rauschen der Störsignale unterschieden werden kann.

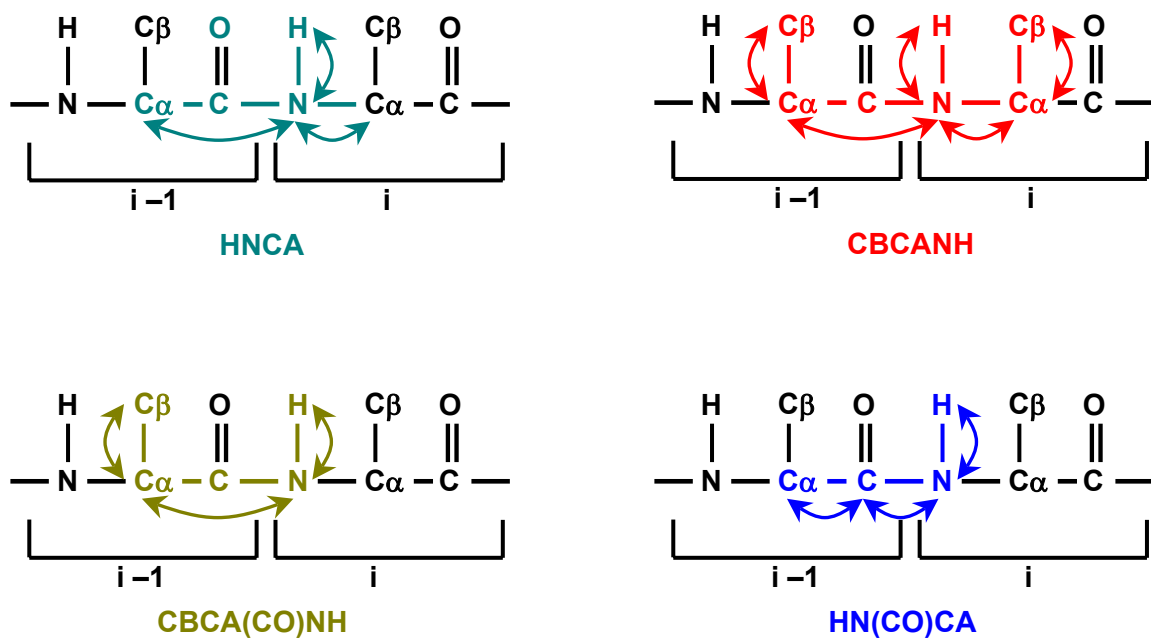


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Magnetisierungstransfers der Tripelresonanzexperimente, die für die Zuordnung des Proteinrückgrats von Nore1-RBD eingesetzt wurden. Die Pfeile vollziehen den Kohärenztransferpfad nach.

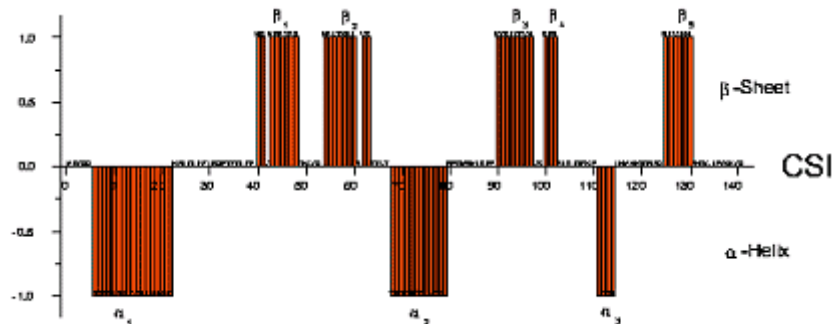
## 4. NMR-Struktur der RBD von AF6

### 4.1. Sekundärstruktur von AF6-RBD

#### 4.1.1. Sekundärstrukturvorhersage durch chemische Verschiebung

In seiner Dissertation gelang es Guido Steiner [Ste10] 93 % des Proteinerückgrats dieser Domäne sequentiell zuzuordnen. Für die Aminosäuren 119 bis 123 in der Primärsequenz von AF6 besteht eine Zuordnungslücke, die nicht geschlossen werden konnte. Die chemischen Verschiebungen aus der sequentiellen Zuordnung erlauben eine Vorhersage der Sekundärstrukturelemente von AF6, wie sie in Steiners Arbeit bereits vorgestellt wurde und hier noch einmal gezeigt werden soll.

In Abbildung 20 wird das Ergebnis aus der Berechnung des chemical shift index (CSI) gezeigt, wie er sich aus der sequentiellen Zuordnung für AF6-RBD ergibt.



*Abbildung 20: Darstellung des chemical shift index (CSI) von AF6-RBD in Abhängigkeit von der Position innerhalb der Primärsequenz wie sie sich aus der Zuordnung von G. Steiner ergeben.*

Im CSI-Plot ergeben sich für die RBD von AF6 3  $\alpha$ -Helices und 4-5  $\beta$ -Stränge. Es ist jedoch fraglich, ob es sich bei den  $\beta$ -Strängen 3 und 4 tatsächlich um zwei getrennte  $\beta$ -Faltblätter handelt oder ob sich an dieser Stelle in der Primärsequenz lediglich ein einzelner  $\beta$ -Strang befindet. Aus den Daten des CSI-Plots lassen sich für die einzelnen Sekundärstrukturelemente von AF6-RBD folgende Regionen in der Aminosäuresequenz des Proteins vorhersagen: drei  $\alpha$ -Helices (H1: Arg6 - Ala22, H2: Thr68 - Phe79, H3: Leu111 - Gln114) und 4-5  $\beta$ -Stränge (B1: His40 - Gln48, B2: Asn54 - Ser63, B3: Lys90 - His97, B4: Gly100 - Arg102 und B5: Arg 125 - Asn130).



[illegible][illegible]

Abbildung 21: Zugeordnete interresiduale Signale in Abhängigkeit von der Sequenz, die für die Sekundärstruktur kennzeichnend ist.  $\alpha$ -helikale Bereiche in der Sequenz sind ockerfarben markiert, während  $\beta$ -Faltblattregionen blaugrün hervorgehoben sind.

Die drei  $\alpha$ -Helices weisen das typische Muster an sequentiellen NOE-Kontakten der Amid-Protonen  $d_{\text{NN}(i,i+1)}$ ,  $d_{\alpha\text{N}(i,i+3)}$ ,  $d_{\alpha\beta(i,i+3)}$  auf. Die  $\beta$ -Faltblätter sind durch  $d_{\alpha\text{N}(i,i+1)}$ -, und  $d_{\text{NN}(i,i+1)}$ -Kontakte definiert. In Abbildung 21 sind die verschiedenen NOE-Kontakte von AF6 dargestellt.

Die Definition der Sekundärstrukturen durch die NOE-Kontakte korreliert im wesentlichen mit der Vorhersage aus den chemischen Verschiebungen und den CSI-Werten. Es resultieren folgende Sekundärstrukturelemente: drei  $\alpha$ -Helices (H1: Asp7 - Asn21, H2: Thr67 – P81 und H3: P110 – N116) und 4-5  $\beta$ -Faltblätter (B1: Phe39 – Asp49, B2: Asn54 – S63, B3: Lys90 – Glu95, B4: Val98 – Ser99 und B5: Arg125 – Asp133).

Dies ergibt einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von 22% und einen Anteil der  $\beta$ -Faltblätter an der Struktur von AF6 von 34%.



## 4.2. Restraints für die Strukturrechnung

### 4.2.1. NOE-Kontakte

Bei der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von AF6 spielten die Abstände von Protonen zueinander eine wichtige Rolle. Diese ließen sich aus NOE-Signalen ableiten, die aus einem 2D-NOESY- und einem 3D-NOESY-Spektrum stammen. Bei der Zuordnung der beiden 2D- und 3D-NOESY-Spektren traten teilweise doppelte Zuordnungen auf, welche zu Gunsten der NOE-Abstände aus dem 2D-Spektrum auskommentiert wurden. Im Zweifelsfall wurde davon ausgegangen, dass der Distanzwert aus dem 2D NOESY aufgrund der geringeren Relaxationseffekte genauer sein sollte als der aus dem  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC ermittelte Abstand. Diese Vorgehensweise sollte verhindern, dass keine NOE-Einschränkungen in der Strukturrechnung höher gewichtet wurden als andere.

Insgesamt verblieben nach der Bearbeitung der NOE-Listen 1737 NOE-Distanzbeschränkungen, die für die Berechnung der AF6-Struktur verwendet wurden. Die Zusammensetzung nach den entsprechenden NOE-Typen ist in nachfolgender Tabelle aufgelistet. Die Bezeichnung NOE-Typ  $|i-j|$  bezieht sich auf den Positionsabstand zweier Reste in der Aminosäuresequenz von AF6-RBD.

NOE-Kontakt	Anzahl
intraresiduelle NOEs ( $i=j$ )	781
sequentielle NOEs ( $ i-j  = 1$ )	396
kurzreichweitige NOEs ( $ i-j  \leq 4$ )	201
langreichweitige NOEs ( $ i-j  > 4$ )	359
Gesamt	1737

*Statistik der zweifelsfrei zuordenbaren NOE-Einschränkungen. Die aufgelisteten NOE-Kontakte sind Bestandteil der Datenbasis für die Strukturrechnung.*

In Abbildung 22 ist die Art und Anzahl der NOE-Einschränkungen für jede Aminosäure dargestellt. Man kann dabei deutlich die flexiblen Loopregionen und die wenig definierten N- und C-terminalen Bereiche im Protein von den definierten Sekundärstrukturelementen unterscheiden. Für den Bereich der Aminosäuren 119 bis 123 fehlen aufgrund der sequentiellen Zuordnungslücke die entsprechenden NOE-Abstandsbeschränkungen.

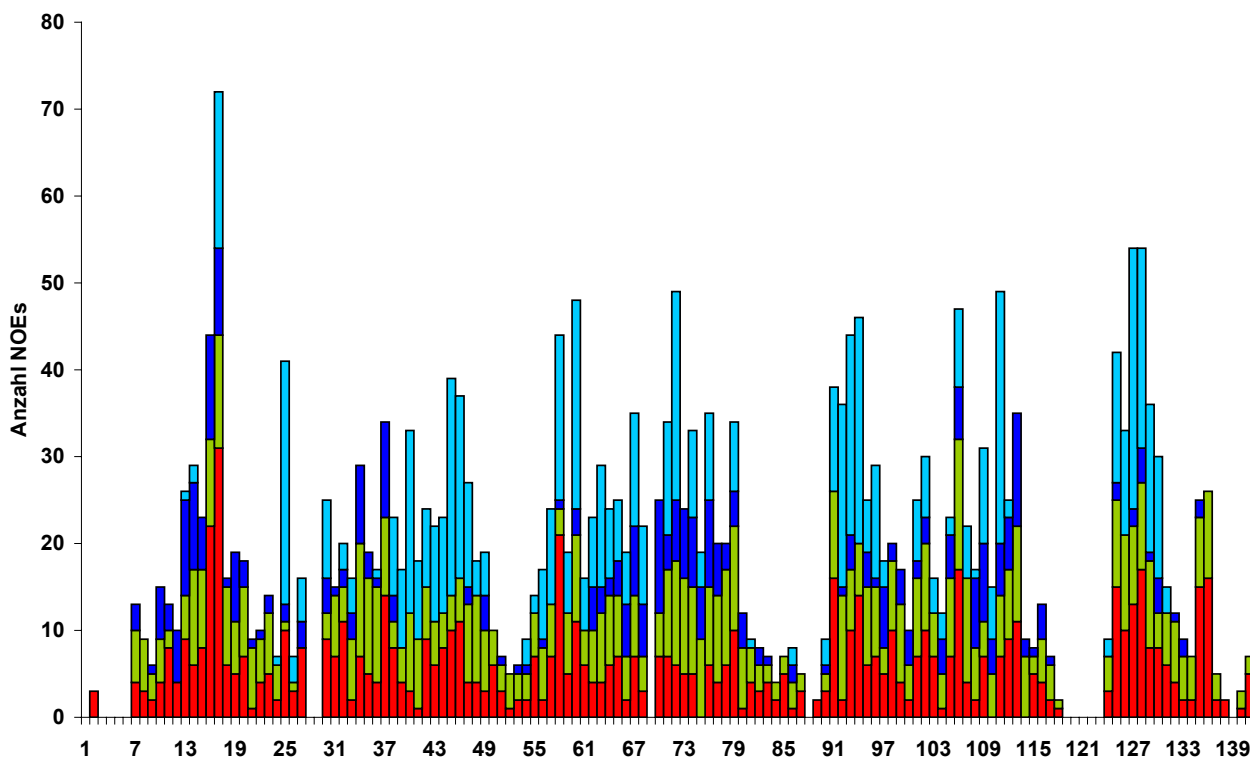


Abbildung 22: Statistik der NOE-Einschränkungen für die Strukturrechnung von AF6-RBD. Die Darstellung zeigt die 1737 NOE-Abstandsbeschränkungen unterteilt in die einzelnen NOE-Typen für jede Aminosäure des Proteins. (Rot: intraresiduelle NOEs ( $i=j$ ), grün: sequentiell benachbarte NOEs ( $|i-j|=1$ ), dunkelblau: kurzreichweitige NOEs ( $1 < |i-j| \leq 4$ ), hellblau: langreichweitige NOEs ( $|i-j| > 4$ )).

#### 4.2.2. Wasserstoffbrücken

Für die Definition der AF6-Sekundärstruktur spielen neben den NOE-Distanzbeschränkungen auch Wasserstoffbrückenbindungen eine wichtige Rolle. Sie gehören zu den wichtigsten Wechselwirkungen bei der Ausbildung und Stabilisierung von Sekundärstrukturelementen. Bei  $\beta$ -Faltblättern werden die stabilisierenden H-Brücken zwischen den benachbarten  $\beta$ -Strängen eines Faltblatts ausgebildet. In  $\alpha$ -Helices werden die Wasserstoffbrücken zwischen dem Amid-Proton der Aminosäure  $i$  und dem Carbonyl-Sauerstoff des Restes  $i-4$  ausgebildet. Die H-Brücken liegen dabei nahezu parallel zur Hauptachse der  $\alpha$ -Helix. Die Lage der Wasserstoffbrücken ließ sich sowohl durch die Daten aus den Amidprotonen-Austauschmessungen als auch über die Informationen aus der Auswertung der NOE-Kontaktmuster (s. Abschnitt 4.1.2) über die Sekundärstruktur erschließen.

Bei der Definition der Abstandsbeschränkungen wurde die Länge einer  $N^H$ -O-Bindung auf 1,9 Å und der Abstand zwischen einem N- und O-Kern längs der Bindung auf 2,9 Å festgelegt.

Eine Zusammenstellung der für die Strukturrechnung eingesetzten Abstände der 96 Wasserstoffbrücken ist im Anhang zu finden.

### 4.2.3. Diederwinkel

Die Diederwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  legen die Konformation des Protein-Rückgrats fest und haben somit entscheidenden Einfluß auf die Proteinsekundär- und –tertiärstruktur. Je nach Strukturelement nehmen diese Winkel dabei charakteristische Werte an. Wegen sterischer Abstoßung der Seitenketten können diese Winkel außerdem nur in bestimmten Bereichen liegen. Aus diesem Winkelraum lassen sich Winkelbeschränkungen für die Strukturrechnung gewinnen, welche sich mit dem Programm TALOS [Cor99] durch die Analyse der chemischen Verschiebungen von Protonen, Stickstoff- und Kohlenstoffatomen berechnen lassen. Für die Berechnung der AF6-Struktur wurden 73 Einschränkungen für Diederwinkel verwendet.

## 4.3. Tertiärstruktur der AF6-RBD

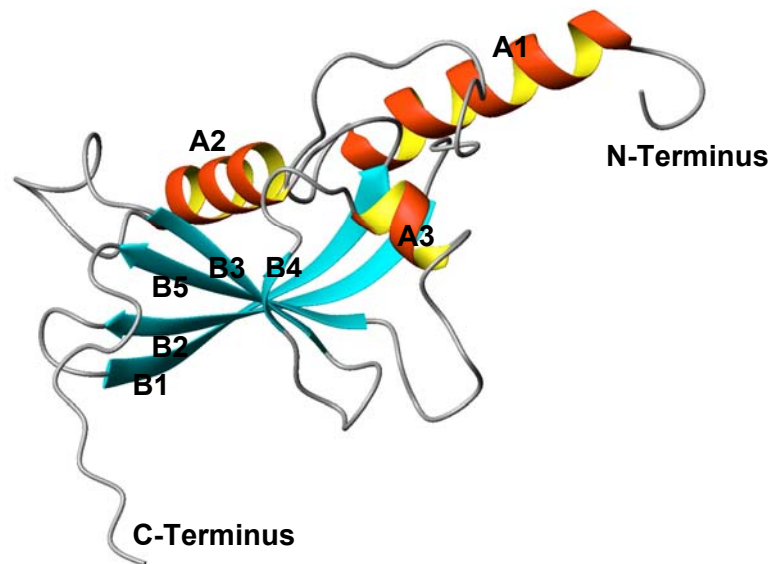
Die Datenbasis zur Berechnung der Proteinstruktur von AF6-RBD mit dem Moleküldynamik-Programm CNS [Brü98] bilden die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Einschränkungen des Konformationsraumes, die sich wie folgt zusammensetzen:

Art der Beschränkungen		Anzahl der Beschränkungen
NOE-Kontakte	gesamt	1737
	intraresiduelle ( $i = j$ )	781
	sequentielle ( $ i - j  = 1$ )	396
	kurzreichweitige ( $ i - j  \leq 4$ )	201
	langreichweitige ( $ i - j  > 4$ )	359
Wasserstoffbrücken		96
Diederwinkel		73
Gesamt		1906

Die mit CNS berechneten Strukturen von AF6-RBD umfassen die Aminosäuren 1-141 der Domänenstruktur des Proteins AF6. Damit ergeben sich im Mittel 13,5 Einschränkungen für jeden Aminosäurerest.

Jeder Rechnungslauf mit CNS bestand aus 1000 gerechneten Strukturen, von denen jeweils die zehn energetisch Besten nach der Gesamtpseudoenergie mit dem Skript *cnsstat* [Ste01] ermittelt wurden. Unter Energie-Minimierung durch Eliminierung oder Überprüfung und

gegebenenfalls Neuordnung falscher Einschränkungen wurde in einem iterativen Prozess ein Ensemble aus den zehn "pseudoenergieärmsten" und "wahrscheinlichsten" Strukturen ermittelt.



*Abbildung 23: Tertiärstruktur der AF6-RBD. Die Domäne besteht aus drei  $\alpha$ -Helices und einem gemischten, fünfsträngigem, antiparallelem  $\beta$ -Faltblatt. Der C- (AS 131-141) und der N-Terminus (AS 1-5) sind frei beweglich.*

Der strukturelle Aufbau dieser Ras-Bindedomäne erwies sich verglichen mit den bisher bekannten Strukturen anderer RBDs als weitgehend identisch. AF6 besteht aus einem fünfsträngigen gemischten  $\beta$ -Faltblatt, welches durch zwei  $\alpha$ -Helices ergänzt wird. Bei diesem Proteinfaltungsmuster spricht man von einem Ubiquitin  $\alpha/\beta$ -roll. Vergleicht man die anderen in ihrer Struktur bekannten RBDs mit AF6, so fällt auf, dass diese am N-terminal gelegenen Ende noch eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix hat und die Loopregionen verlängert sind.

Die Sekundärstrukturelemente von AF6 (1-141) treten sequentiell in dieser Reihenfolge im Molekül auf: von den Residuen Arg6 - Asn21 Helix A1, Gly41 - Asp49 Faltblatt B1, Asn54 - Val62 Faltblatt B2, Thr68 - Phe79 Helix A2, Tyr91 - Glu95 Faltblatt B3, Arg103 - Leu104 Faltblatt B4, Pro110 - Leu115 Helix A3 und von den Residuen Arg125 - Asn130 das Faltblatt B5.

Eine auf NMR-Daten basierende und errechnete Struktur stellt generell nur eine „Momentaufnahme“ eines Makromoleküls dar, da es ständigen dynamischen Prozessen unterworfen ist. Es ist daher schwierig, eine klare Aussage darüber zu treffen, welche Struktur eines Makromoleküls denn die „richtige“ sei. Es macht aber durchaus Sinn, zur Bewertung von Strukturen verschiedene Parameter auf ihre Stimmigkeit und Konvergenz zu überprüfen.

Betrachtet man diese Parameter in der Gesamtheit der Strukturbeurteilung, erhält man Aufschluß über die Qualität der Struktur. Solche Parameter sind vorrangig die Energien, wie z.B. die NOE-Energien oder die Energien aus den Verletzungen von definierten Bindungslängen. Eine Verletzung einer Distanzbeschränkung führt zur Erhöhung der zugehörigen NOE-Energie. So sind geringe Energiewerte ein Gradmesser für die Erfüllung dieser Einschränkung bei der errechneten Struktur.

Energien	[kJ/mol]
<b>E<sub>Bindungslängen</sub></b>	<b>271 ± 3,77</b>
<b>E<sub>Bindungswinkel</sub></b>	<b>1251 ± 21</b>
<b>E<sub>van-der-Waals-Wechselwirkungen</sub></b>	<b>1502 ± 30</b>
<b>E<sub>NOE</sub></b>	<b>1807 ± 46</b>
<b>E<sub>Diederwinkel</sub></b>	<b>125 ± 3,77</b>
<b>E<sub>IMP</sub></b>	<b>175 ± 8,91</b>
<b>E<sub>Gesamt</sub></b>	<b>5133 ± 27</b>

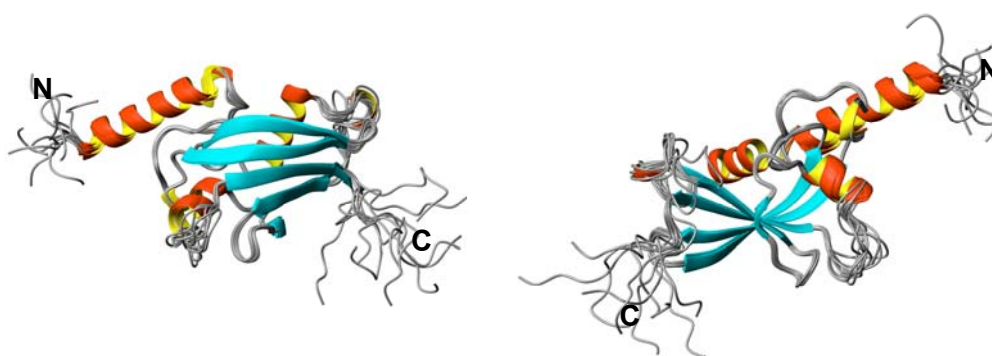
*Tabelle 1: Energiewerte der NMR-Struktur von AF6-RBD. Verletzungen dieser Beschränkungen bei der Strukturrechnung führen aufgrund von "intramolekularen Spannungen" zur Erhöhung der jeweiligen Energien. Dementsprechend sind niedrige Energien ein Qualitätsmerkmal einer Struktur. In der Tabelle aufgelistet sind die Mittelwerte aus den energetisch 10 besten Strukturen und die jeweilige Standardabweichung von insgesamt 1000 berechneten Strukturen.*

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Güte einer Struktur ist der RMSD-Wert (root mean square deviation). Die RMSD-Werte zur mittleren Struktur geben ein Maß dafür, wie sehr die Position jedes Atoms einer Struktur in einem gegebenen Bündel variiert. In dieser Arbeit wird der RMSD-Wert als ein Maß für die Konvergenz der energetisch besten aller aus einem Ensemble von gerechneten Strukturen verwendet. Dazu wurden die zehn energetisch besten aus jeweils 1000 gerechneten Strukturen an den Rückgrat-Atomen N, C<sup>α</sup>, C, an den schweren Atomen N, C, O, S im Bereich der Aminosäuren Arg6 bis Glu131 bzw. nur an den Sekundärstrukturelementen mit dem Programm MOLMOL [Kor96] überlagert und der RMSD-Wert zur gemittelten Struktur berechnet. Die N-terminalen Residuen 1-5, sowie die am C-terminalen Ende gelegenen Residuen 132-141 sind unstrukturierte Regionen, welche bei der Ermittlung des RMSD-Wertes nicht berücksichtigt wurden. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der zugehörigen RMSD-Werte.

RMSD	[Å]
<b>Rückgrat N, C<sup>α</sup>, C (6-131)</b>	<b>0,584</b>
<b>schwere Atome N,C,O,S (6-131)</b>	<b>0,674</b>
<b>Rückgrat (nur Sekundärstrukturelemente)</b>	<b>0,240</b>
<b>schwere Atome (nur Sekundärstrukturelemente)</b>	<b>0,247</b>

*Tabelle 2: RMSD-Werte (in Å) der Struktur von AF6-RBD. Bei den Sekundärstrukturelementen wurden die bereits weiter oben erwähnten Aminosäurenresiduen für die RMSD-Wert-Berechnung selektiert. Es wurden jeweils die zehn energetisch besten Strukturen aus einem Ensemble von 1000 gerechneten Strukturen ausgewählt.*

Nach 1000 gerechneten Strukturen mit dem Programm CNS (Version 1.1) wurden die 10 besten Strukturen nach dem niedrigsten Wert der gesamten Verletzungsenergien ausgewählt und mit dem Programm MOLMOL [Kor96] übereinandergelagert. Abbildung 24 zeigt das Ensemble der zehn besten Strukturen in zwei verschiedenen Ansichten.



*Abbildung 24: Überlagerung der zehn energetisch besten Strukturen der Ras-Bindedomäne von AF6. Die Überlagerung an den Rückgrat-Atomen (N, C<sup>α</sup>, C) von Arg6 bis Glu131 der NMR-Strukturen und die Berechnung des RMSD-Wertes erfolgte mit dem Programm MOLMOL [Kor96].*

Die Diederwinkel  $\phi$  und  $\psi$  können aus sterischen Gründen nur bestimmte Kombinationen annehmen. Die Darstellung der Winkelverteilungen im Ramachandran-Plot wurde mit dem Programm MOLMOL [Kor96] erstellt. Es wurden bei der Darstellung alle Bereiche der AF6-RBD einschließlich der flexiblen N- und C-terminalen Regionen (Met1 bis Gly5 und Asn131 bis Gln141) berücksichtigt.

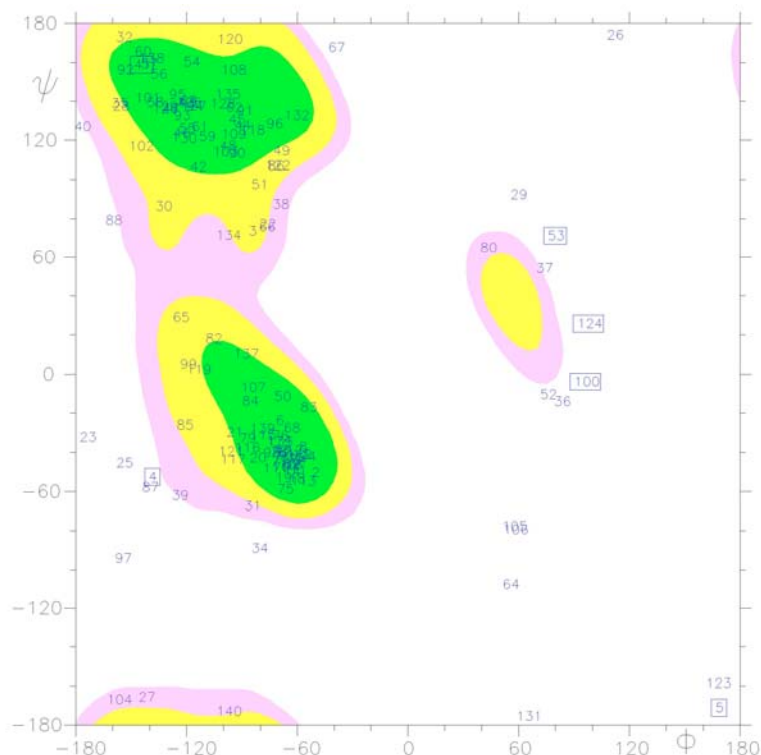


Abbildung 25: Verteilung der Diederwinkel  $\varphi$  und  $\Psi$  im Ramachandran-Plot. Die blauen Zahlen geben die Aminosäurepositionen innerhalb der Sequenz an. Glycine sind durch eine kastenförmige Umrandung kenntlich gemacht. Man sieht einen Großteil der Winkel in den bevorzugten Bereichen.

Ein weiterer für die NMR vergleichbarer Qualitätsfaktor, der sogenannte R-Wert (RFAC, [Gro00]), vergleicht ein benanntes experimentelles NMR-Spektrum mit einem zurückgerechneten Spektrum, welches sich auf eine bestimmte Strukturvorstellung bezieht. Damit können sowohl globale R-Werte (für die ganze Struktur) als auch für bestimmte Teile (z.B. Sekundärstrukturelemente) oder für unterschiedliche Distanzklassen (long-range, short-range NOEs) berechnet werden. Diese R-Faktoren geben dann Aufschluss darüber, wie gut die jeweilige für die Rückrechnung eingesetzte Struktur mit den tatsächlichen experimentellen Daten übereinstimmt. Durch Vergleich von rückgerechneten und experimentellen Spektren kann schließlich die Qualität berechneter Strukturen mittels R-Werten bestimmt werden.



Distanzklasse des R-Faktors	R-Wert der entsprechenden Kategorie für die AF6-RBD
alle Signale	0,412
intraresiduelle Signale	0,163
sequentielle Signale	0,173
mittelreichweitige Signale	0,208
langreichweitige Signale	0,217
interresiduelle Signale	0,196

*Tabelle 3: R-Werte für die verschiedenen Distanzklassen von AF6-RBD.*

Sämtliche bisher gerechnete Strukturen wurden mit dem Strukturrechenprogramm CNS in einem Modus gerechnet, der nicht das Molekül mit seinen Wechselwirkungen in seinem natürlichen Lösungsmittel – dem Wasser – berücksichtigt. Gewichtet man die hierfür nötigen Parameter im Moleküldynamik-Kraftfeld geringer, läßt sich der oft mehrere Tage umfassende Computer-gesteuerte Rechenaufwand minimieren. Bezieht man die Interaktionen des Moleküls mit dem Lösungsmittel durch eine höhere Gewichtung "nicht-bindender" Parameter wie zum Beispiel schwache NOE-Kontakte mit dem Lösungsmittel ein, führt dies in der Strukturrechnung zu einer signifikanten Verbesserung der Struktur [Lin99, Xia02]. Eine höhere Gewichtung dieser Parameter in der Strukturverbesserung (waterrefinement) bedingt die Annäherung der Proteine an die natürlichen Bedingungen und damit auch einer Vorstellung ihrer natürlichen Struktur auf rechnerischem Wege.

Die Daten-Basis der Strukturverbesserung von AF6 bilden die zehn energetisch besten Strukturen aus der Strukturrechnung mit CNS und die experimentell ermittelten Einschränkungen des Konformationsraumes. Unter Berücksichtigung der Einschränkungen wurden die zehn besten Strukturen bei entsprechender Gewichtung der Kraftfelder mit dem Programm XPLOR-NIH verfeinert. Man erhält neben den zehn verfeinerten Strukturen zusätzlich die Analyse der in die Rechnung eingebrachten und der verfeinerten Strukturen. Diese Analysen ermöglichen eine Quantifizierung der Strukturverbesserung, die aufgrund der unterschiedlichen Kraftfeld-Gewichtungen bei herkömmlicher Strukturrechnung und der Verfeinerung nicht möglich ist.

Analysierte Strukturen		Verbesserte Strukturen	
Art der Verletzung	Energie[kJ/mol]	Art der Verletzung	Energie[kJ/mol]
E <sub>NOE</sub>	2464,5 ± 112,1	E <sub>NOE</sub>	455,3294 ± 12,1
E <sub>dihedrale Winkel</sub>	15 ± 0,44	E <sub>dihedrale Winkel</sub>	14,43418 ± 2,3
E <sub>Gesamt</sub>	5416,7 ± 110,5	E <sub>Gesamt</sub>	-3850,877 ± 166,5
RMSD / mittlere Struktur		RMSD / mittlere Struktur	
	nm		nm
Rückgrat	3,39 ± 1,22	Rückgrat	3,47 ± 1,01
alle schweren Atome	3,9 ± 1,07	alle schweren Atome	4,07 ± 0,86
Ramachandran / Region		Ramachandran / Region	
	Anzahl		Anzahl
meist favorisiert	65,24 ± 2,45	meist favorisiert	70,71 ± 2,28
erlaubt	21,03 ± 2,83	erlaubt	19,61 ± 2,28
generell erlaubt	7,42 ± 2,07	generell erlaubt	4,13 ± 1,18
nicht erlaubt	6,31 ± 1,39	nicht erlaubt	5,54 ± 1,39
WHATCHECK (structure Z-scores)		WHATCHECK (structure Z-scores)	
Ramachandran plot appearance	-4,17 ± 0,31	Ramachandran plot appearance	-3,22 ± 0,24
2 <sup>nd</sup> generation packing quality	-3,65 ± 0,12	2 <sup>nd</sup> generation packing quality	-3,08 ± 0,16
χ <sub>1</sub> ·χ <sub>2</sub> rotamer normality	-6,87 ± 0,23	χ <sub>1</sub> ·χ <sub>2</sub> rotamer normality	-3,66 ± 0,25
Backbone conformation	-15,44 ± 1,73	Backbone conformation	-12,58 ± 1,64
Overall quality (packing score)	-65,32 ± 6,52	Overall quality (packing score)	-53,09 ± 5,96

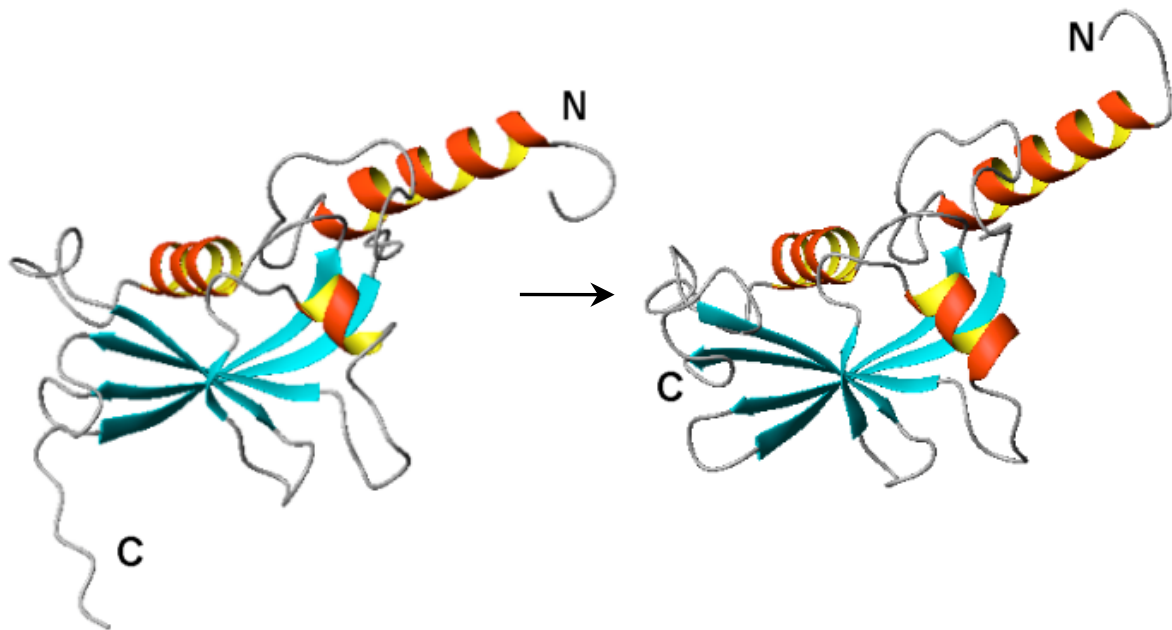
*Tabelle 4: Parameter zur Beurteilung der Qualität der AF6-Struktur vor und nach der Verfeinerung unter Berücksichtigung von Wasser als Lösungsmittel. Durch das Einbeziehen der Interaktionen mit dem Lösungsmittel in die Strukturverfeinerung werden die Energien als Maß der Verletzung der Einschränkungen wie erwartet geringer. Die Verteilung der Diederwinkel nach Ramachandran haben sich durch die Strukturverbesserung ebenfalls deutlich verbessert. Es wurden jeweils die Mittelwerte der zehn Eingangs- bzw. verfeinerten Strukturen und die zugehörige Standardabweichung angegeben.*

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Strukturverbesserung von AF6-RBD graphisch dargestellt. Die Strukturverbesserung, welche nach der Methode von Linge und Spronk [Lin03] erfolgte, führte zu einer deutlichen Verringerung der Gesamt-Energie des Moleküls und einer Verschiebung der Diederwinkel  $\phi$  und  $\Psi$  in den bevorzugten Bereich (Tabelle 4).

Sind die Diederwinkel  $\phi$  und  $\Psi$  erfüllt, findet man sie in der Darstellung eines Ramachandran-Plots in den bevorzugten, erfüllten und erwarteten Kombinationsbereichen. Von eingangs 65,24 Winkel-Kombinationen liegen nach der Verbesserung 70,71 Kombinationen im bevorzugten Bereich. Der relativ hohe RMSD-Wert ergibt sich aufgrund des automatisierten Analyse-Verfahrens mit PROCHECK, bei dem das gesamte Molekül einschließlich der frei beweglichen Termini analysiert wird. Es zeigte sich, dass bei diesem Verfahren zur Strukturverbesserung der RMSD-Wert als Maßstab schwierig zu beurteilen und zu vergleichen ist. Die Energien und Winkelverteilungen im Ramachandran-Plot stellen bessere quantitative Kriterien zur Beurteilung einer verfeinerten Struktur dar.

<b>Analysierte Struktur</b>	<b>→</b>	<b>Verbesserte Struktur</b>
-----------------------------	----------	-----------------------------

A)



B)

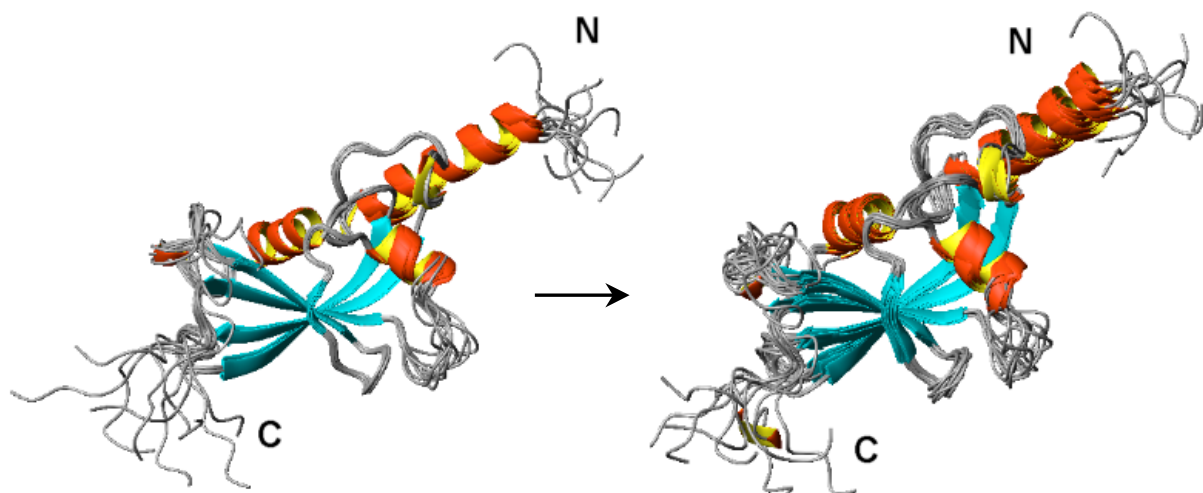


Abbildung 26: Graphische Darstellung der verfeinerten Struktur nach dem Verfahren von Linge und Spronk. A) Tertiärstruktur von AF6-RBD vor (links) und nach (rechts) der Verbesserung der Struktur im Lösungsmittel. B) Überlagerung der jeweils zehn Eingangsstrukturen (links) und der verfeinerten (rechts) Strukturen. Überlagert wurden die Aminosäuren des Proteinrückgrats der Residuen 7-130. Der RMSD-Wert vor und nach der Strukturverbesserung in Wasser beträgt 0,0582 nm bzw. 0,094 nm.

Vergleicht man die RMSD-Werte vor und nach der Verfeinerung der AF6-RBD, stellt man eine geringere Konvergenz der verfeinerten Strukturen ersichtlich, an einem höheren RMSD-Wert der verbesserten Strukturen, fest. Dies ist eine Folge des bei der Strukturrechnung angewandten Verfahrens, bei dem stärker gewichtete "nicht-bindenden" Parameter zur Geltung kommen.

## 4.4. Interaktion von AF6 mit H-Ras und Rap1A

Mitte der neunziger Jahre wurden von Kuriyama und Mitarbeiter im Rahmen einer Studie die Bindung von AF6 an H-Ras nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass AF6 vorzugsweise an Rap1 bindet [Boe00]. Nachdem von allen drei Molekülen – AF6, H-Ras und Rap1A - bereits aufgeklärte Strukturen vorhanden sind, ermöglichen Kenntnisse der Bindungsstellen der an einer Interaktion beteiligten Proteine eine Dockingsimulationsrechnung, an deren Ende eine Struktur des Komplexes beider interagierender Moleküle steht.

Da von einem der Interaktionspartner bereits eine NMR-Struktur mit sequentieller Zuordnung zur Verfügung steht, ist es möglich, mittels NMR-Methoden die Bindungsstellen von AF6-RBD für H-Ras und Rap1A zu identifizieren. Das Prinzip beruht auf dem direkten Vergleich von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von ungebundenem AF6 mit den Spektren von AF6 im komplexierten Zustand. Änderungen der Resonanzen der Amid-Protonen und Signal-Volumina geben Aufschluss darüber, welche Aminosäuren bzw. Proteinregionen direkt von der Bindung betroffen sind oder aufgrund der Bindung eine Konformationsänderung erfahren.

Zur Identifizierung der H-Ras und Rap1A-Bindungsfläche von AF6 wurden von Guido Steiner [Ste01] Titrationsexperimente mit AF6 und seinem jeweiligen Bindungspartner durchgeführt. Die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse aus den Titrationsexperimenten wurden in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die nachfolgende Komplexstrukturrechnung mit dem Programm HADDOCK [Dom03] durchgeführt. Die Beweglichkeit der an der Komplexbildung beteiligten Regionen beider Dockingpartner wurden zur Berechnung der Molekülkomplexe AF6•H-Ras und AF6•Rap1A gleich behandelt: In AF6-RBD werden die Regionen der Aminosäuren 7-31, 52-62 und 77-84 und die Aminosäuren von H-Ras und Rap1A für die Bereiche 30-45 und 60-75 im Proteinrückgrat starr gehalten, während die Seitenketten frei beweglich bleiben, um bei der Komplexbildung eine möglichst naturgetreue Zusammenlagerung der Interaktionspartner zu ermöglichen. Diese fünf Regionen der beiden Dockingpartner AF6/H-Ras oder AF6/Rap1A entsprechen den definierten Bindungsstellen der Moleküle.

### 4.4.1. Docking von AF6 an H-Ras

Der erste Schritt zur Vorbereitung einer Dockingsimulationsrechnung ist die Festlegung der Bindungsregionen beider interagierender Moleküle. Die Kernspinresonanz-Spektroskopie bietet im Falle der Kenntnis einer NMR-Struktur mindestens eines Bindungspartners die Möglichkeit der Titration des durch NMR strukturell bekannten Bindungspartners mit dem anderen Molekül. Der Vergleich der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren mit denen des ungebundenen Moleküls und des im Komplex gebundenen Moleküls zeigt  $\text{H}^{\text{N}}$ -Signale von

Aminosäureresiduen an, die an der Wechselwirkung beider Interaktionspartner beteiligt sind. Kommt es bei der Titration zu einer Wechselwirkung beider Moleküle in der Probe, so können deren Effekte im Spektrum quantitativ erfasst werden.

Die Titrationsmessungen wurden im Rahmen der Dissertation von Guido Steiner [Ste01] vorgenommen. Die daraus erhaltenen Daten bilden die Grundlage der Komplexstrukturrechnung mit dem Programm HADDOCK [Dom03].

Im ersten Schritt einer Dockingsimulationsrechnung mit HADDOCK müssen die Interaktionsflächen der beiden Bindungspartner festgelegt. Dabei gilt es zu unterscheiden, ob die für die Wechselwirkung ausgewählten Aminosäureresiduen eines Moleküls aktiv an der Bindung beteiligt sind oder lediglich eine passive Rolle bei der Komplexbildung spielen. Eine Aminosäure, die als bindungsaktiv definiert wird, muss mit einer als aktiv oder passiv definierten Aminosäure des anderen Interaktionspartners eine Bindung eingehen, während eine als bindungspassiv definierte Aminosäure lediglich eine Wechselwirkung mit einem Aminosäurerest des anderen Interaktionspartners eingehen kann. Wird eine Aminosäure als aktiv an der Komplexbildung eingestuft, weiß man, dass sie an der Wechselwirkung beteiligt ist oder es lässt sich anhand der Auswertungen aus den Titrationsmessdaten erschließen, dass die Aminosäure an der Bindung beteiligt sein muss. Überschreitet der Wert der Aminosäure beim entsprechenden Auswerteverfahren mindestens den Mittelwert plus einer Standardabweichung, so spricht dies für einen auffälligen Effekt der Komplexbildung auf die entsprechende Aminosäure. Außerdem sollte die Lösungsmittelzugänglichkeit der Aminosäure größer als 30 % sein. Eine als passiv bindungsbeteiligt eingestufte Aminosäure ist einer aktiven Aminosäure an der Proteinoberfläche benachbart und hat eine hohe Lösungsmittelzugänglichkeit. Zusätzlich sollte die Aminosäure bei der Auswertung der Titrationsmessungen durch Überschreiten des entsprechenden Mittelwertes auffallen.

Aus den Titrationsmessungen lassen sich für AF6 zwei verschiedene Arten von Effekten als Reaktion auf die Komplexbildung ablesen. Einen wichtigen Hinweis auf lokale strukturelle Veränderungen, die auf der Komplexbildung beruhen, erhält man aus der Analyse, welche Proteinsignale eine Verschiebung ihrer Resonanzfrequenz erfahren.

Dargestellt ist dieser Effekt weiter unten in der Abbildung 27. Ändern sich die chemischen Verschiebungen um einen Wert, der größer ist als die einfache Standardabweichung vom Mittelwert, stellt dies eine signifikante chemische Verschiebungsänderung dar. Diejenigen Aminosäuren von AF6, die entweder direkt an der Komplexbildung beteiligt sind, oder indirekt durch eine Konformationsänderung des im Komplex gebundenen AF6 betroffen sind, erfahren durch die bei der Komplexbildung sich ändernden chemischen Umgebung der Kerne signifikant große Änderungen der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Protonenresonanzen im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experiment. Signifikante Änderungen der chemischen Verschiebungen zeigen die Aminosäuren Gly41, Val42, Lys50, Ala51, Gly53, Phe55, Val71, Arg84, Ser92, Leu93, Glu95 und Val96. Möglicherweise sind diese Aminosäuren an der Bindung mit H-Ras beteiligt.

Zusätzliche Informationen über Aminosäuren, die von der Komplexbildung betroffen sind, lassen sich noch von einem zweiten Effekt, der sich im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experiment zeigt, ableiten. Direkt oder durch Konformationsänderungen indirekt an der Bildung des

Komplexes beteiligte Aminosäuren erfahren neben einer Änderung der chemischen Verschiebungen auch eine Abnahme der Volumina (Abbildung 28).

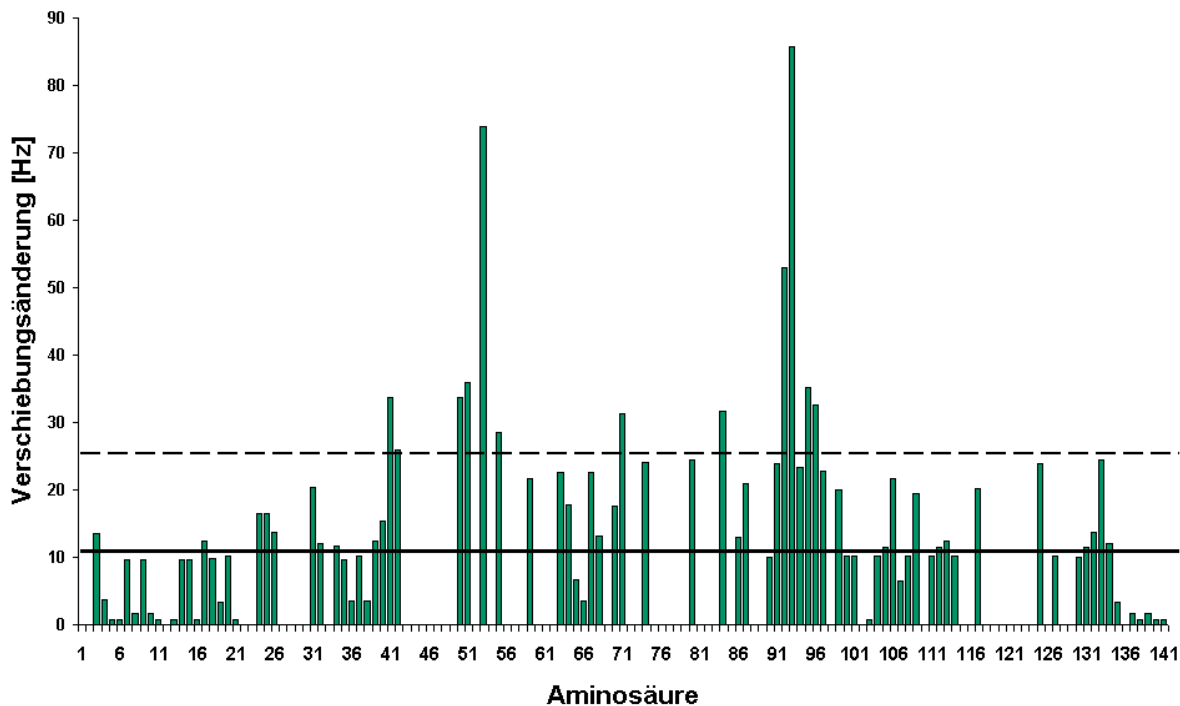


Abbildung 27: Änderung der chemischen Verschiebungen der Amid-Protonen von AF6 induziert durch Komplexbildung mit H-Ras. Der durchgezogene Balken entspricht dem Mittelwert (11,91) und der gestrichelte Balken der einfachen Standardabweichung ( $\pm 14,17$ ).

Der Wert für die Änderung des Volumens einer Aminosäure berechnet sich aus dem Quotienten zwischen der Peakintensität (Signalvolumen) im AF6-Vergleichsspektrum und der Intensität des unverschobenen Signals im AF6•H-Ras-Spektrum. Ist der Quotient der Signalvolumina größer als die einfache Standardabweichung vom Mittelwert, ist dies als eine signifikante Signalamplitudenabnahme zu deuten.

Signifikante Änderungen der Signalvolumina zeigen die Aminosäuren Arg44, Phe45, Tyr46, Phe47, Gln48, Asp49, Ala56, Thr57, Lys58, Ile60, Arg61, Val62, Leu75, Ala76, Glu77, Lys78, Phe79, Met85, Phe126 und Lys129.



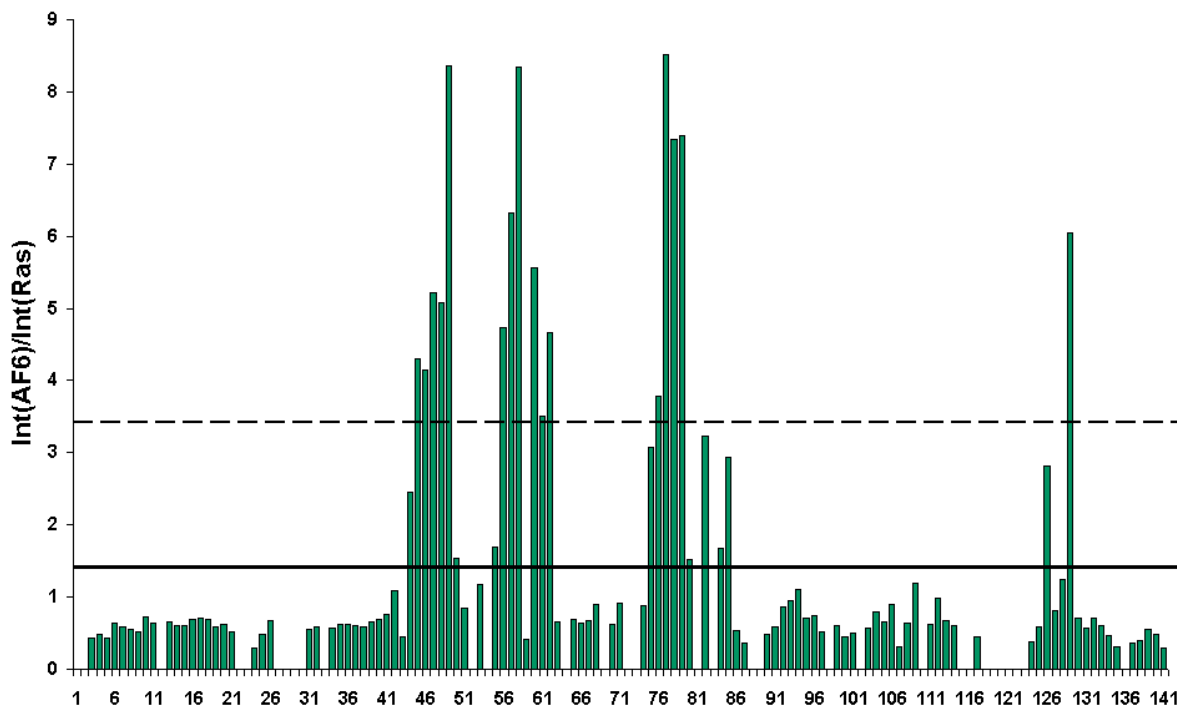
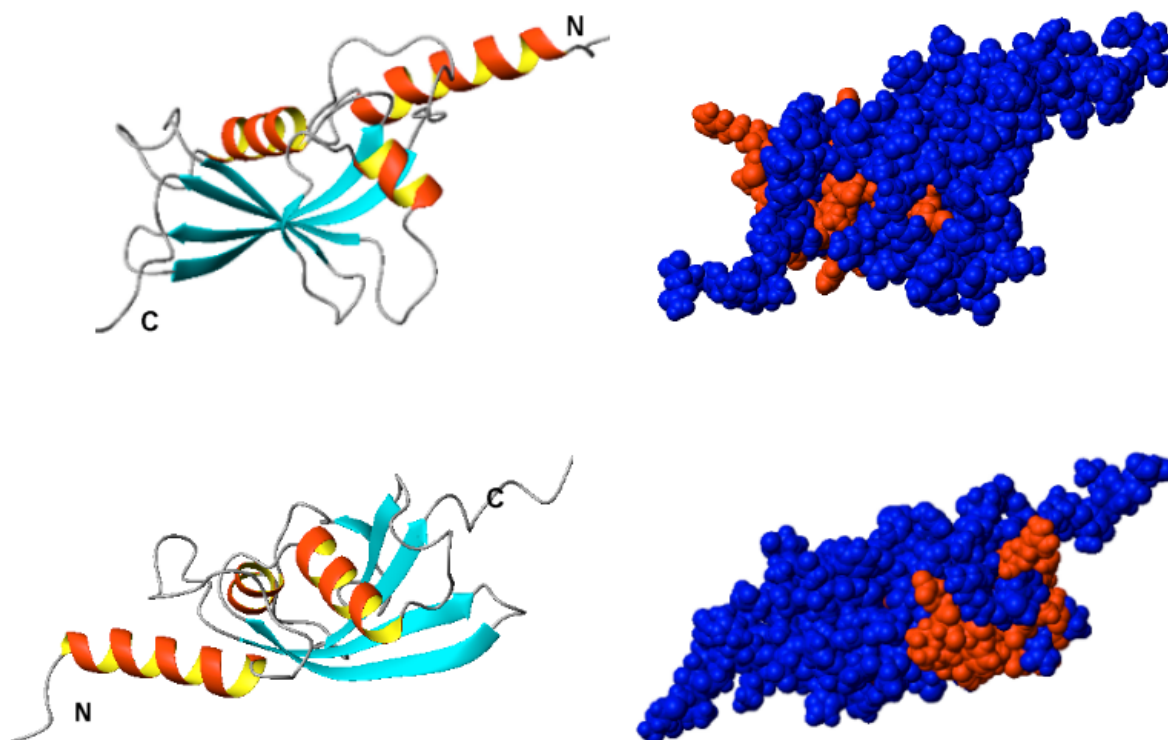


Abbildung 28: Änderung der Signal-Volumina der  $H^N$ -Kerne von AF6 durch die Komplex-Bildung mit H-Ras. Der durchgezogene Balken entspricht dem Mittelwert (1,5) und der gestrichelte Balken der einfachen Standardabweichung ( $\pm 1,95$ ). Sind die Änderungen bei den Volumina größer als die einfache Standardabweichung vom Mittelwert, stellen sie signifikante Änderungen dar.

Abbildung 30 zeigt die Verteilung der Aminosäureresiduen auf dem AF6-Molekül, welche nach der Auswertung der Titrationsmessungen als signifikant eingestuft wurden. Da nicht nur die an der Bindung von H-Ras beteiligten Aminosäuren in AF6 in den Titrationsmessungen signifikant erscheinen, sondern auch Residuen, die durch eine Konformationsänderung des im Komplex gebundenen AF6 in eine chemisch veränderte Umgebung gebracht wurden, muss anschließend die wahrscheinlichste Bindungsstelle von AF6 für H-Ras evaluiert werden. Wie lassen sich die an der H-Ras-Bindung beteiligten Aminosäureresiduen aus dem Pool der signifikanten Residuen selektieren?



*Abbildung 29: Verteilung der AF6-Residuen auf dem Molekül, wie sie sich aus den Daten der Titrationsmessung ergeben (rot gefärbt). Die Struktur von AF6 ist in zwei verschiedenen Darstellungen (links das Bändermodell und rechts eine raumfüllende Darstellung) in zwei unterschiedlichen räumlichen Orientierungen gezeigt.*

Aus bereits untersuchten Ras-Bindedomänen im Komplex mit einem Ras-Molekül [Nas95, Sche01] weiß man, dass die Wechselwirkung beider Moleküle im Wesentlichen von einem intermolekularen  $\beta$ -Faltblatt ausgeht, das die beiden Moleküle miteinander ausbilden.

Eine Hilfestellung zur Eingrenzung der AF6-Binderegion für H-Ras stellen die Hinweise aus den entsprechenden Veröffentlichungen [Sche01, Nas95, Goh03] dar, denen zufolge sich die Binderegionen der untersuchten Ras-Effektoren überwiegend auf die  $\beta$ -Stränge  $\beta 1$  und  $\beta 2$  beschränken. Aus den Auswertungen der Titrationsexperimente weiß man, dass die Dichte an auffälligen Residuen für diese  $\beta$ -Faltblatt-Regionen in AF6 relativ hoch war. Für die Komplexstrukturrechnung mit HADDOCK ist es notwendig, möglichst nur eine gut definierte Bindungsregion für jeden Bindungspartner auf dem Molekül ausfindig zu machen. Die Bindungsstelle von AF6 für H-Ras sollte demnach eine zusammenhängende Region auf dem Molekül bilden, deren einzelne Aminosäureresiduen mit ihren Seitenketten in einem möglichst hohen Maße oberflächen zugänglich sein sollten. Zusätzlich liefern bereits untersuchte Komplexe von Ras-Effektoren mit ihrem Ras-Molekül Hinweise zur Definition einer Binderegion von AF6 für H-Ras [Goh03, Sche01].

Aminosäure		Signifikanter		Oberflächen- zugänglichkeit in %	Struktur
		$\Delta$ chem. shift	$\Delta$ Vol		
Gly	41	X		1	B1
Val	42	X		16	B1
Arg	44		X	36	B1
Phe	45		X	0	B1
Tyr	46		X	16	B1
Phe	47		X	4	B1
Gln	48		X	23	B1
Asp	49		X	11	L
Lys	50	X		25	L
Ala	51	X		17	L
Gly	53	X		22	L
Phe	55	X		49	B2
Ala	56		X	10	B2
Thr	57		X	32	B2
Lys	58		X	5	B2
Ile	60		X	0	B2
Arg	61		X	13	B2
Val	62		X	0	B2
Val	71	X		0	A2
Leu	75		X	0	A2
Ala	76		X	1	A2
Glu	77		X	34	A2
Lys	78		X	31	A2
Phe	79		X	34	A2
Arg	84	X		64	L
Met	85		X	27	L
Ser	92	X		7	B3
Leu	93	X		0	B3
Glu	95	X		2	B3
Val	96	X		8	B3
Phe	126		X	1	B5
Lys	129		X	8	B5

Tabelle 5: Übersicht über die Ergebnisse aus den Titrationsmessungen. Alle hier aufgeführten Aminosäuren von AF6 erfahren bei der Komplexbildung mit H-Ras signifikante Effekte, die sich aus dem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experiment ableiten lassen. Durch die Bindung von AF6 an H-Ras ändert sich die chemische Verschiebung der  $^1\text{H}$ -Signale oder/und dessen Volumen. Die Oberflächenzugänglichkeit, welche für die Komplexbildung eine wichtige Rolle spielt, wurde für jede aufgeführte Aminosäure mit MOLMOL [Kor96] berechnet. Die Sekundärstruktur-Elemente sind farbig hinterlegt (ocker für  $\beta$ -Strang und blaugrün für  $\alpha$ -Helix).

Die Lageverteilung der in der Tabelle 5 aufgeführten Aminosäuren auf dem AF6-Molekül wurde bereits in der Abbildung 29 gezeigt. Es ist anzunehmen, dass nicht alle Residuen an einer Bindung mit H-Ras beteiligt sein können, da in dem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum

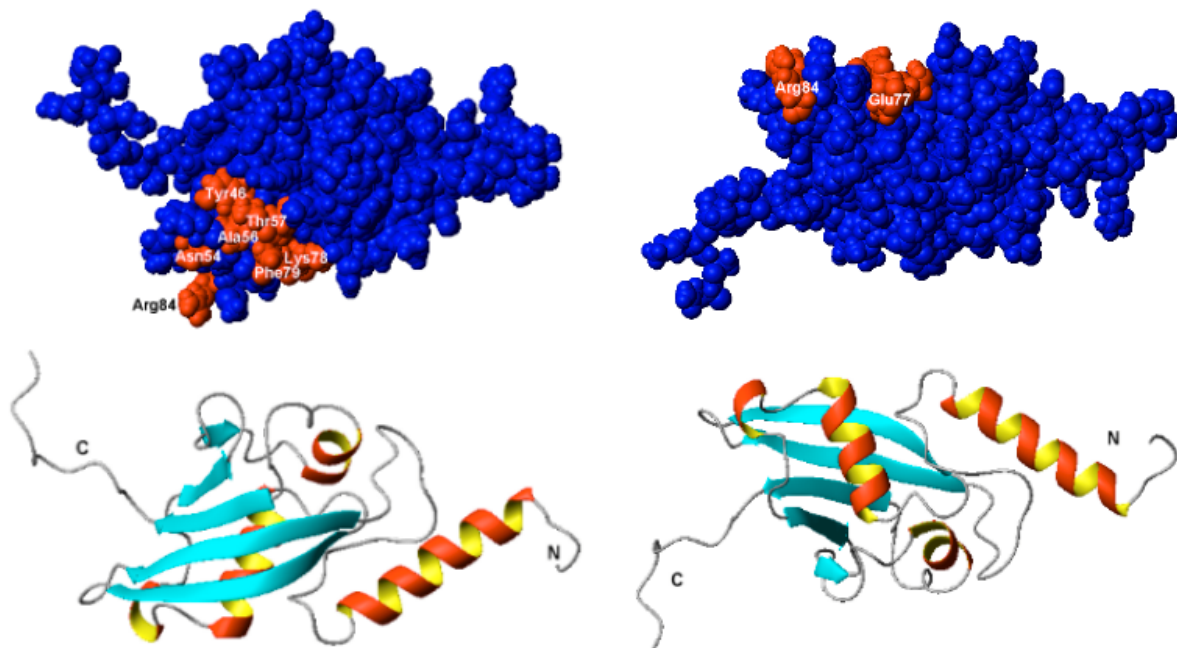
aus den Titrationsmessungen auch  $H^N$ -Signale von Aminosäuren eine Volumensänderung oder Änderung ihrer chemischen Verschiebung erfahren, wenn sie nicht an der Bindung beteiligt sind, sondern lediglich von einer Konformationsänderung des AF6-Moleküls durch die Komplexbildung mit H-Ras betroffen sind. Bezieht man zur Änderung des Signalvolumens und der chemischen Verschiebung des  $H^N$ -Signals im  $^1H$ - $^{15}N$ -TROSY-HSQC-Spektrum die Oberflächenzugänglichkeit der zugehörigen Aminosäure mit ein, lässt sich für AF6 eine annähernd zusammenhängende Region für die Sekundärstrukturelemente B1, B2 und A2 als Binderegion für das H-Ras-Molekül definieren. Die einzelnen Aminosäuren werden in Tabelle 6 aufgelistet.

Aminosäure	AS-Nr.	Strukturelement
Arg	44	B1
Tyr	46	B1
Asn	54	B2
Ala	56	B2
Thr	57	B2
Lys	58	B2
Glu	77	A2
Lys	78	A2
Phe	79	A2
Arg	84	Loop

*Tabelle 6: Aminosäuren von AF6, die möglicherweise an der H-Ras-Bindung beteiligt sind. Die Aminosäuren bilden eine annähernd zusammenhängende Region auf dem Molekül aus und ihre Seitenketten sind Lösungsmittelzugänglich. Die Sekundärstrukturelemente sind farbig hinterlegt (ocker:  $\beta$ -Strang, blaugrün:  $\alpha$ -Helix).*

Die Aminosäure Asn54 wurde unabhängig von den Ergebnissen aus den Titrationsmessungen nachträglich in die Liste der möglichen bindungsaktiven Aminosäuren aufgenommen. Sequenzvergleiche mit den bereits strukturell bekannten Ras-Effektoren RalGef und C-Raf1 [Goh3, Nas95] deuteten darauf hin, dass diese Aminosäure im  $\beta$ -Strang B2 hochkonserviert ist und bei der Bindung mit dem entsprechenden Ras-Molekül eine wichtige Rolle spielt.

In Abbildung 30 sind die Aminosäuren von AF6, die entweder direkt oder indirekt an der Bindung von H-Ras beteiligt sind, graphisch dargestellt.



*Abbildung 30: Bindungsfläche von AF6. Die Struktur von AF6 ist in zwei unterschiedlichen Darstellungen in zwei verschiedenen Orientierungen (um 180 ° entlang der x-Achse gedreht) gezeigt (oben als raumfüllendes und unten als Bändermodell). In der raumfüllenden Darstellung ist die H-Ras Bindungsfläche von AF6 rot eingefärbt.*

Der zweite Bindungspartner H-Ras war ebenfalls in seiner dreidimensionalen Struktur bekannt und konnte nach entsprechender Modifizierung als Eingangsstruktur für die Simulationsrechnung mit HADDOCK verwendet werden. Als Anfangsstruktur wurde die H-Ras-Variante ausgewählt, deren Struktur aus dem Röntgenkristall des strukturell aufgeklärten Komplexes von Byr2-RBD•H-Ras [Sche01] bekannt war (Code für die Proteindatenbank: 1K8R) [RCBS].

Die an der Interaktion beteiligten Residuen von Ras kennt man aus anderen bereits strukturell untersuchten Ras-Effektor-Komplexen. Daher weiß man, dass die den Komplex stabilisierenden polaren Wechselwirkungen sich überwiegend auf den Bereich der Switch I-Region in Ras beschränken [Goh03, Pac00]. Da sowohl die Switch I- als auch die Switch II-Region in H-Ras mit der Bindung eines Effektors eine konformationelle Änderung erfahren, wurden die Aminosäuren, welche die Switch II-Region (Residuen 61-72) umfassen, als passiv bindungsfähig definiert, während in der Dockingsimulation davon ausgegangen wird, dass die Aminosäuren 32-44 in H-Ras direkt an der Ausbildung des AF6-RBD•H-Ras-Komplexes beteiligt sind.

Die Autoren von HADDOCK [Dom03] schlagen einen wissensbasierten Ansatz zur Definition der Bindungsoberfläche beider Interaktionspartner vor. Alle aus Veröffentlichungen über die Ras•Effektor-Komplexe bekannten Informationen wurden bei der Definition der AIRs

berücksichtigt, so zum Beispiel hochkonservierte Aminosäuren, die in der sequentiellen Überlagerung bekannter RBDs auffallen oder Daten aus den Mutationsanalysen von Prof. Dr. C. Herrmann. Die erwähnten Mutagenesedaten von AF6-RBD für den Komplex mit H-Ras besagen, dass der Austausch R44A einen Anstieg der  $K_D$  von 2,2 auf 99  $\mu\text{M}$  bewirkt. Ein Austausch von K78A in AF6-RBD führt zu einer  $K_D$  von 16,3  $\mu\text{M}$ . Die mit diesen Aminosäuren durchgeführten Mutationsanalysen in AF6-RBD und die daraus resultierende Erhöhung der Dissoziationsrate des Komplexes deutet darauf hin, dass beide Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des AF6-RBD•H-Ras-Komplexes spielen. Die in Tabelle 7 aufgelisteten Bindungspartner seitens H-Ras für die Aminosäuren Arg44 und Asn54 von AF6-RBD werden hier als komplementär für Arg44 zu den Aminosäuren Arg74 (Byr2-RBD) [Sche01], Arg59 (Raf), Arg16 (RalGDS) [Goh03] und für Asn54 von AF6 als komplementär zur Aminosäure Asn64 (Raf) [Goh03] eingestuft<sup>3</sup> (s. Anhang).

AF6-RBD	H-Ras
Arg44	Glu37
Asn54	Arg41
Lys78	Asp30/Glu31

Tabelle 7: Eindeutige Gewichtung dieser Aminosäurenpaare im Dockingprotokoll. Da Asp30 und Glu31 (H-Ras) eine negative Ladung tragen, kommen beide bevorzugt für das positiv geladene Lys78 (AF6) als Bindungspartner in Frage.

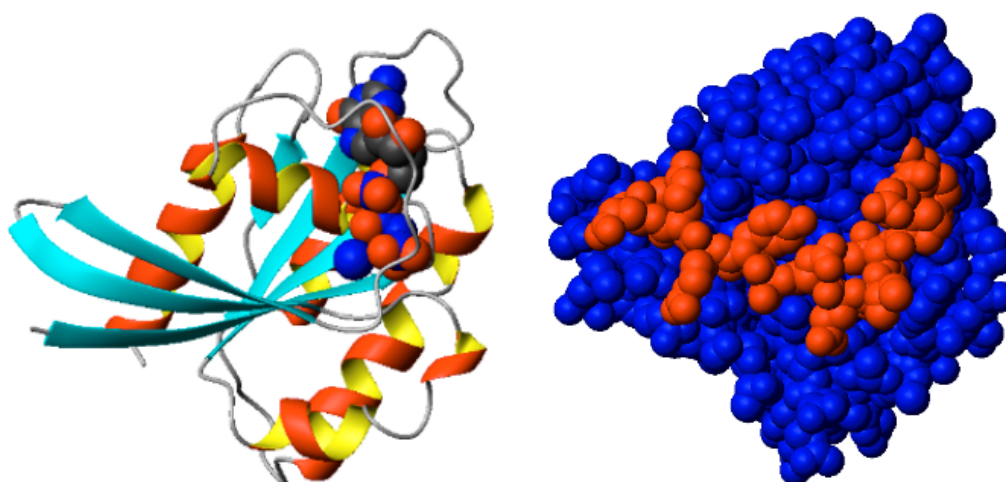
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
H-Ras	M	T	E	Y	K	L	V	V	V	G	A	G	G	V	G	K	S	A	L	T	I	Q	L	I	Q	N	H	F	V	D	E	Y	D	P	T	I	E	D	S	Y
H-Ras	M	T	E	Y	K	L	V	V	V	G	A	G	G	V	G	K	S	A	L	T	I	Q	L	I	Q	N	H	F	V	D	E	Y	D	P	T	I	E	D	S	Y
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
H-Ras	R	K	Q	V	V	I	D	G	E	T	C	L	L	D	I	L	D	T	A	G	Q	E	E	Y	S	A	N	R	D	Q	Y	M	R	T	G	E	G	F	L	C
H-Ras	R	K	Q	V	V	I	D	G	E	T	C	L	L	D	I	L	D	T	A	G	Q	E	E	Y	S	A	N	R	D	Q	Y	M	R	T	G	E	G	F	L	C
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
H-Ras	V	F	A	I	N	N	T	K	S	F	E	D	I	H	Q	Y	R	E	Q	I	K	R	V	K	D	S	D	D	V	P	M	V	L	V	G	N	K	C	D	L
H-Ras	V	F	A	I	N	N	T	K	S	F	E	D	I	H	Q	Y	R	E	Q	I	K	R	V	K	D	S	D	D	V	P	M	V	L	V	G	N	K	C	D	L
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
H-Ras		A	A	R	T	V	E	S	R	Q	A	Q	D	L	A	R	S	Y	G		I	P	Y	I	E	T	S	A	K	T	R	Q	G	V	E	D	A	F	Y	T
H-Ras		A	A	R	T	V	E	S	R	Q	A	Q	D	L	A	R	S	Y	G		I	P	Y	I	E	T	S	A	K	T	R	Q	G	V	E	D	A	F	Y	T
	161	162	163	164	165	166	167	168																																
H-Ras	L	V	R	E	I	R	Q	H																																
H-Ras	L	V	R	E	I	R	Q	H																																

Abbildung 31: Aminosäuresequenz von H-Ras. Die Zahlenreihe gibt die Lage der Aminosäuren in der Sequenz an (türkis eingefärbt:  $\beta$ -Strang, grün:  $\alpha$ -Helix). In der zweiten Reihe werden in dunkelblau die sequentiellen Bereiche für die Switch I- und die Switch II-Region im Molekül angezeigt. In der dritten Reihe sind in rot die Aminosäuren dargestellt, die als bindungsaktive Residuen in die HADDOCK-Rechnung eingehen, orange dargestellt sind Residuen, die als bindungspassive Aminosäuren in der Rechnung Beachtung finden.

<sup>3</sup> Asn64 von Raf interagiert mit Arg41 in Rap1A, Arg39 mit Glu37 in Rap1A [Goh03].



Die Struktur von H-Ras, wie sie in Abbildung 32 gezeigt ist, bildet in seiner Gpp(NH)p-gebundenen Form neben der AF6-RBD die Eingangsstruktur für die Komplexstrukturrechnung mit dem Programm HADDOCK [Dom03]. Die Gpp(NH)p gebundene Ras-Form entspricht dem aktiven bindungsfähigen Zustand von Ras, in dem das Molekül mit seinem Effektor wechselwirken kann. Da Gpp(NH)p im Gegensatz zu GTP nicht intrinsisch hydrolysieren kann, verwendet man für strukturelle Untersuchungen das in seiner Konformation stabilisierte H-Ras•Gpp(NH)p. Die Oberflächenzugänglichkeit der Residuen der Switch I-Region in Ras, welche im wesentlichen die Effektorbindung stabilisieren, liegt zwischen 36 und 76 %



*Abbildung 32: Das H-Ras-Molekül in zwei unterschiedlichen Darstellungen gleicher Orientierungen. Linkes Bild: H-Ras in Ribbon-Darstellung mit gebundenem Gpp(NH)p (in raumfüllender Darstellung). Rechtes Bild: H-Ras in raumfüllender Darstellung (blau). Rot eingefärbt sind die Residuen der Switch I-Region, welche als bindungsaktiv in die Komplexrechnung einfließen.*

Das Strukturmodell des AF6•H-Ras-Komplexes wurde mit dem Moleküldynamikprogramm HADDOCK [Dom03] basierend auf der Röntgenstruktur von H-Ras aus dem Komplex mit Byr2, der Lösungsstruktur von AF6-RBD und den Titrationsdaten erstellt. Für die Strukturrechnung des Komplexes stellen die Strukturen der beiden Interaktionspartner AF6-RBD und H-Ras mit den oben beschriebenen Bindungsstellen die wichtigsten Eingangsdaten für die Moleküldynamikrechnung dar.

Die nachstehende Analyse beruht auf 100 Strukturen, die automatisch im Wasserkasten verfeinert wurden. Bei 100 % der bestimmten Komplexstruktur-Modelle ist die Bindungsfläche von AF6 und H-Ras entsprechend den Vorgaben richtig orientiert.

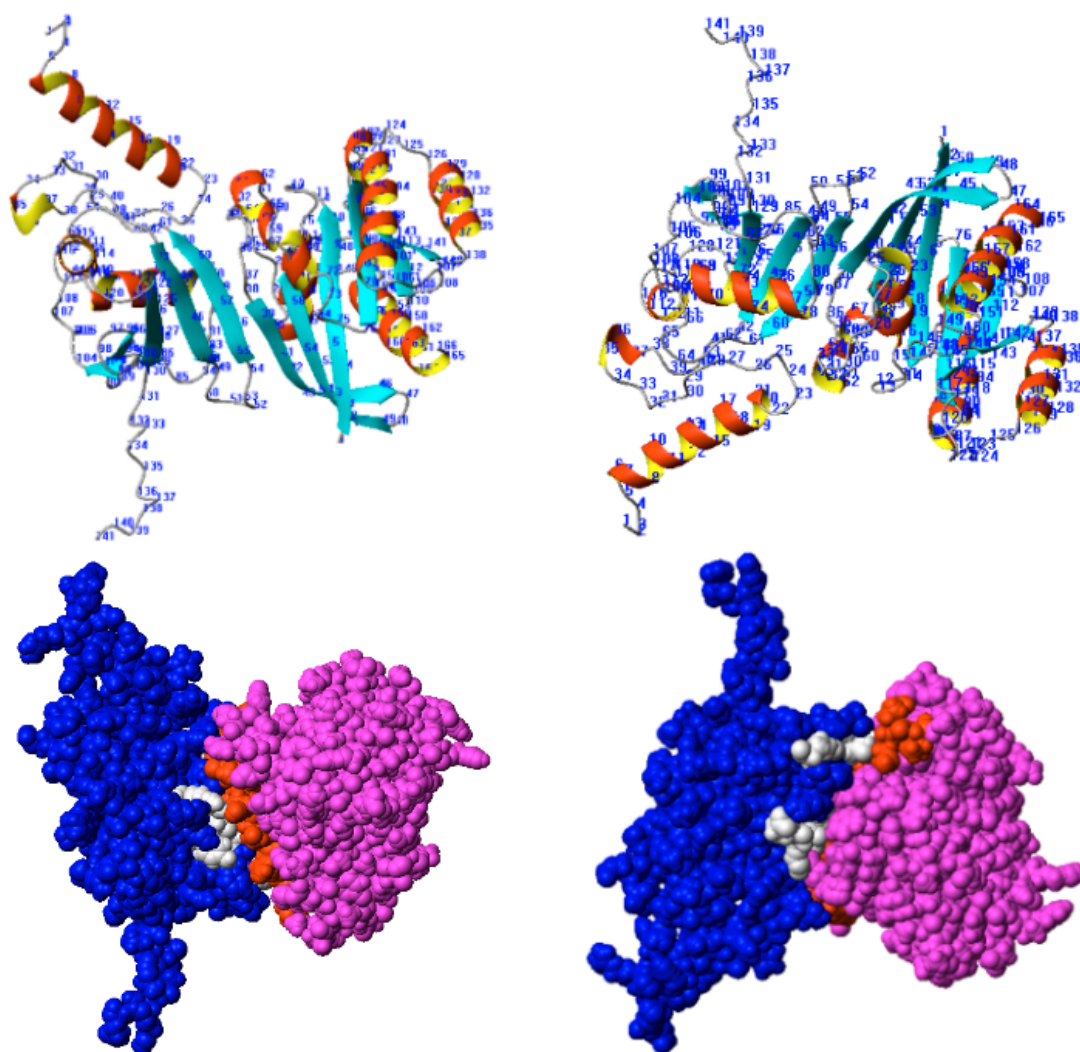


Abbildung 33: Der AF6-Ras-Komplex in zwei verschiedenen Orientierungen. Die Aminosäuren der beiden Moleküle sind in den Ribbon-Darstellungen (oben) nummeriert. In der raumfüllenden Darstellung (unten) befindet sich die RBD von AF6 links (in blau) mit seinen in weiß gefärbten aktiven AIRs. Die aktiven AIRs in H-Ras (in magenta) sind im Komplex rot, die aktiven Residuen in AF6 weiß eingefärbt. Der gezeigte Komplex ist das durchschnittliche Strukturmodell aus den 100 in Wasser verfeinerten Komplexstrukturen.

Da die Interaktionsflächen für beide Moleküle nur relativ kleine Regionen auf der Proteinoberfläche ausmachen, ergaben die mit HADDOCK gerechneten Komplexstrukturen ein einheitliches Bild. In Tabelle 8 werden für die 100 gerechneten Strukturmodelle die einzelnen Energiebeiträge zur Gesamtenergie einer durchschnittlichen Komplexstruktur gezeigt. Haddock führt nach der Berechnung der Komplexstrukturen abschließend eine automatische Cluster-Analyse durch, deren Basis der von Haddock ermittelte RMSD-Wert für jede Komplexstruktur darstellt. Anhand dieser RMSD-Matrix wird bei der Cluster-Analyse ermittelt, ob die Komplexstrukturen Cluster von gleich orientierten Interaktionspartnern bilden. Ein



Cluster war bei der Analyse definiert, wenn mindestens vier Strukturen einen RMSD  $< 1,5 \text{ \AA}$  hatten.

Für die 100 gerechneten AF6•H-Ras-Komplex-Strukturen konnten insgesamt 98 Strukturen zwei verschiedenen Clustern zugeordnet werden. Im Cluster 1 konnten 79 Komplexstrukturen und im Cluster 2 19 Strukturen zu einem Ensemble von Komplexstrukturen zusammengefasst werden.

	Cluster 1	Cluster 2
<b>Anzahl (Komplexstrukturen)</b>	<b>79</b>	<b>19</b>
<b>BSA (buried surface area)</b>	<b><math>1774 \pm 76</math></b>	<b><math>1786 \pm 71</math></b>
<b>Energien [kJ/mol]</b>		
<b><math>E_{\text{inter}}</math></b>	<b><math>-3154 \pm 234</math></b>	<b><math>-2326 \pm 129</math></b>
<b><math>E_{\text{vdW}}</math></b>	<b><math>-251 \pm 29</math></b>	<b><math>297 \pm 29</math></b>
<b><math>E_{\text{elec}}</math></b>	<b><math>-2987 \pm 230</math></b>	<b><math>-2096 \pm 133</math></b>
<b><math>E_{\text{air}}</math></b>	<b><math>-79 \pm 4,18</math></b>	<b><math>66 \pm 4,18</math></b>

*Tabelle 8: Statistik der Energien und der verborgenen Oberfläche der beiden interagierenden Proteine an der Kontaktstelle für die durchschnittliche Komplexstruktur des entsprechenden Clusters nach der Strukturverfeinerung in explizit Wasser.*

Am aussagekräftigsten an der Energiestatistik der beiden Cluster sind die Werte für die BSA und der intermolekularen Protein-Protein Energien  $E_{\text{inter}}$ . Der Wert der BSA gibt Auskunft über die relative Größe der verborgenen Oberfläche zwischen beiden interagierenden Molekülen. Die verborgene Oberfläche der Komplexe durch die Komplexbildung wird berechnet, indem von der Summe der zugänglichen Oberfläche für jedes Molekül die Summe der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des Komplexes subtrahiert wird. Je größer der Wert von BSA, desto größer ist folglich die Interaktionsfläche beider Moleküle im Komplex.

Die Energie der intermolekularen Protein-Protein-Energien  $E_{\text{inter}}$  geben über die "Stärke" der intermolekularen Interaktion der Proteine Auskunft. Die Clusterstatistik in Tabelle 8 zeigt, dass die Strukturkomplexe aus Cluster 1 eine stärkere Wechselwirkung haben müssen, als die Strukturen aus Cluster 2. Laut BSA-Wert ist die Interaktionsfläche in beiden Molekülen jedoch annähernd gleich groß.

Nach Beendigung der Komplexstrukturechnung und der Strukturverfeinerung in Wasser führt das Programm HADDOCK automatische Analysen der gerechneten Komplexe durch. Eine der wichtigsten Analysen von HADDOCK ist die Auflistung der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen für jede der gerechneten Strukturen.

Da ein Molekülkomplex durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird, kann bei deren Kenntnis eine Aussage darüber getroffen werden, welche Aminosäureresiduen in beiden interagierenden Molekülen zur Stabilität des Komplexes beitragen. Da HADDOCK [Dom03] für jede gerechnete Komplexstruktur die Wasserstoffbrückenbindungen einzeln auflistet, wurden die Kontaktlisten der Strukturen zuerst den beiden Clustern zugeordnet. Anschließend wurde die Anzahl für jeden benennbaren Kontakt aus der Zahl von Strukturen aus dem jeweiligen Cluster ermittelt und dessen prozentuale Quote relativ zu den im Cluster zählenden Strukturen bestimmt.

AF6			HRas			Quote der Kontakte in % vom Cluster 1
AS-Nr.	AS	Atom	AS-Nr.	AS	Atom	
55	PHE	O	41	ARG	HN	95
59	CYS	HG	38	ASP	OD1	82
57	THR	O	40	TYR	HH	82
57	THR	HG1	39	SER	O	78
57	THR	OG1	39	SER	HN	77
59	CYS	HG	38	ASP	OD2	71
55	PHE	HN	41	ARG	O	71
79	PHE	O	27	HIS	HE2	66
23	ASN	O	32	TYR	HN	66
24	ARG	HE	33	ASP	OD1	54
59	CYS	HN	38	ASP	OD2	48
59	CYS	HN	38	ASP	OD1	44
44	ARG	HH22	37	GLU	OE2	44
44	ARG	HH21	37	GLU	O	42
24	ARG	HE	33	ASP	OD2	41
79	PHE	O	25	GLN	HE22	35
54	ASN	OD1	42	LYS	HZ3	35
24	ARG	HH21	33	ASP	OD1	35
57	THR	HN	39	SER	O	33
61	ARG	HH12	64	TYR	OH	30
61	ARG	HH22	34	PRO	O	30

AF6			HRas			Quote der Kontakte in % vom Cluster 2
AS-Nr.	AS	Atom	AS-Nr.	AS	Atom	
55	PHE	O	39	SER	HN	84
54	ASN	OD1	41	ARG	HN	68
24	ARG	HH21	33	ASP	OD2	63
24	ARG	HE	33	ASP	OD1	63
24	ARG	HH21	33	ASP	OD1	58
55	PHE	O	39	SER	HG	53
24	ARG	HE	33	ASP	OD2	53
79	PHE	O	40	TYR	HH	47
52	ALA	O	41	ARG	HH21	47
58	LYS	HZ2	38	ASP	OD2	42
78	LYS	HZ1	33	ASP	OD1	32
58	LYS	HZ3	38	ASP	OD2	32
57	THR	HN	37	GLU	O	32
24	ARG	HH22	34	PRO	O	32
23	ASN	OD1	32	TYR	HN	32

*Tabelle 9: Auftreten einer spezifischen Art von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen in den jeweiligen Clustern. Die H-Kontakte sind nach ihrer prozentualen Häufigkeit in den zum Cluster zählenden Komplexstrukturen aufgelistet.*

Anhand der gezeigten Ergebnisse aus den Komplexstrukturrechnungen für den Komplex zwischen AF6-RBD und H-Ras lässt sich zeigen, dass sich von insgesamt 100 gerechneten und in Wasser verfeinerten Strukturen zwei Cluster ergeben, deren Komplexstrukturen von unterschiedlichen intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden.

#### 4.4.2. Docking von AF6 an Rap1A

Nachdem das Protein AF6 als ein Effektor von H-Ras identifiziert werden konnte, stellte sich die Frage nach Funktion und Bedeutung des Proteins. Schon bald konnte gezeigt werden, dass AF6 vorzugsweise mit Rap1 [Boe00] wechselwirkt. Dabei kontrolliert AF6 die Integrin-vermittelte Zelladhäsion zum Fibronectin [Cha94].

Die Dissoziationskonstante des AF6•Rap1A-Komplexes liegt bei 0,2  $\mu\text{M}$  und ist somit um den Faktor 14 niedriger als beim AF6•H-Ras-Komplex. Da sich Sequenz und Struktur von H-

Ras und Rap1A nur geringfügig unterscheiden – die Sequenzidentität liegt bei 52 % - stellt sich die zentrale Frage, durch welche Interaktion der Komplex zwischen AF6-RBD und Rap1A stabilisiert wird. Sind es strukturelle Unterschiede in Rap1A, die zu dieser Komplexstabilität führen oder sind bei der Komplexbildung in AF6 andere Residuen beteiligt als im Komplex AF6•H-Ras?

Um diese Frage zu klären, eignet sich die in Kapitel 3.3.1 beschriebene Vorgehensweise. Mit einer bereits von G. Steiner durchgeführten Titrationsmessung [Ste10] lassen sich Aminosäuren in AF6 identifizieren, deren Amidprotonen durch die Komplexbildung mit Rap1A eine signifikante Änderung ihrer chemischen Verschiebungen und der Peakintensität erfahren. Ist das  $^1\text{H}$ -Signal einer Aminosäure auffällig von einem dieser Effekte im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum betroffen, lässt sich dieser Aminosäurerest nach Analyse seiner Oberflächenzugänglichkeit für das Lösungsmittel Wasser als bindungsaktiv für die HADDOCK-Komplexstrukturrechnung definieren.

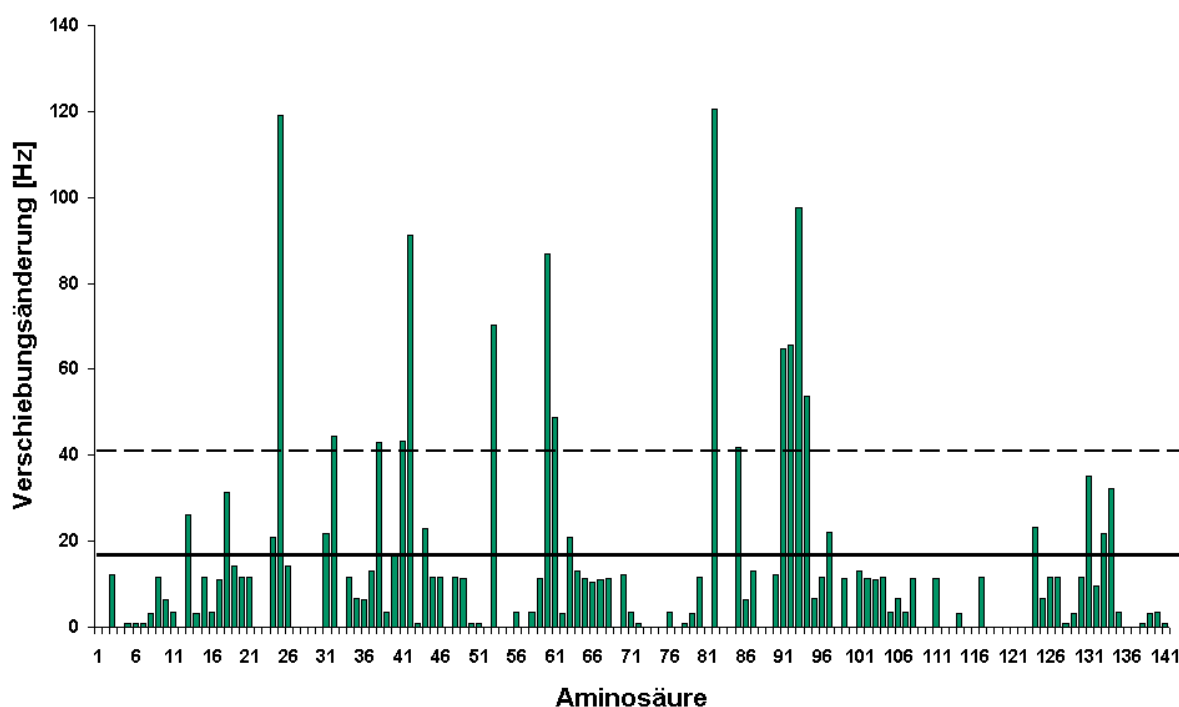


Abbildung 34: Änderung der chemischen Verschiebungen der Amid-Protonen in AF6 durch die Komplexbildung mit Rap1A. Der durchgezogene Balken entspricht dem Mittelwert (16,25) und der gestrichelte Balken der einfachen Standardabweichung ( $\pm 23,75$ ).

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse aus den Titrationsmessungen von AF6 mit Rap1A dargestellt. Die Auswertung bezieht sich auf die Änderungen der chemischen Verschiebungen des Amidprotons (in Hz). Sind die Änderungen der chemischen Verschiebungen aus dem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum für ein Amidproton einer Aminosäure von AF6 signifikant (dies trifft zu, wenn der Wert der Änderung im Diagramm den Mittelwert plus eine Standardabweichung überschreitet), deutet diese Tatsache darauf hin, dass die betreffende

Aminosäure an der Interaktion von beiden Molekülen beteiligt ist oder von konformationellen Änderungen des AF6-Moleküls infolge der Komplexbildung mit Rap1A betroffen ist. Für die Änderungen der chemischen Verschiebungen konnten folgende Aminosäuren in AF6 als signifikant eingestuft werden: Leu25, Gln32, Glu38, Gly41, Val42, Gly53, Ile60, Arg61, Asp82, Met85, Tyr91, Ser92, Leu93 und Tyr94.

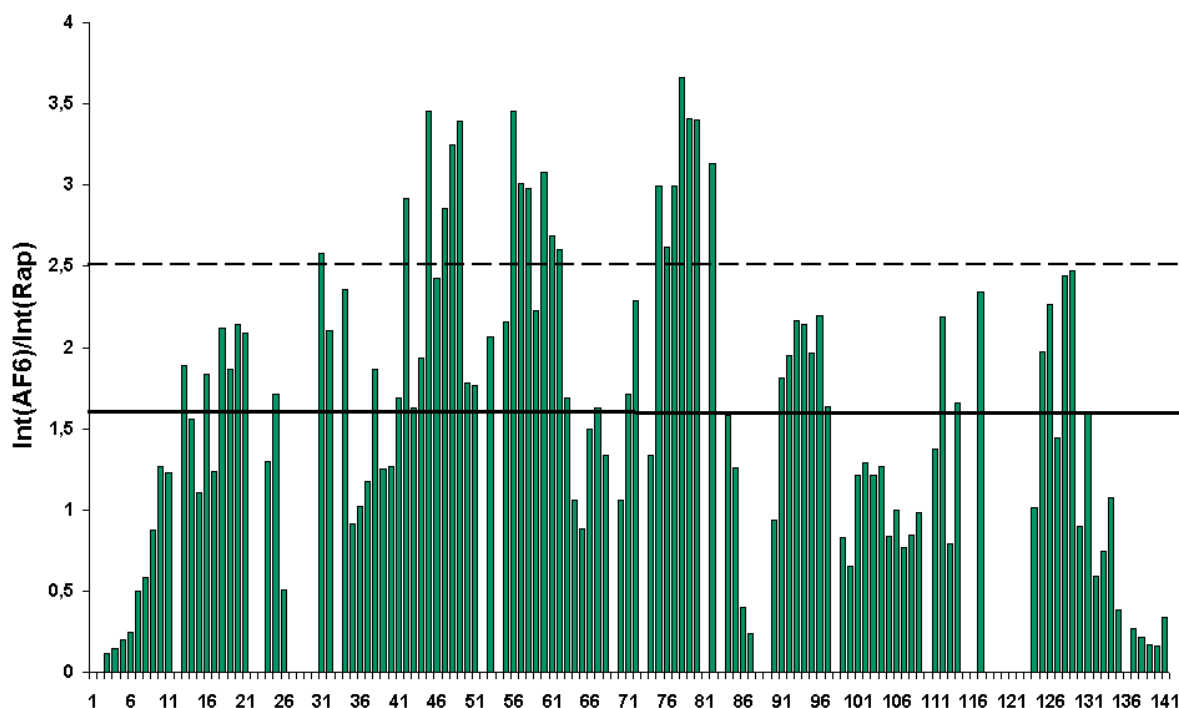
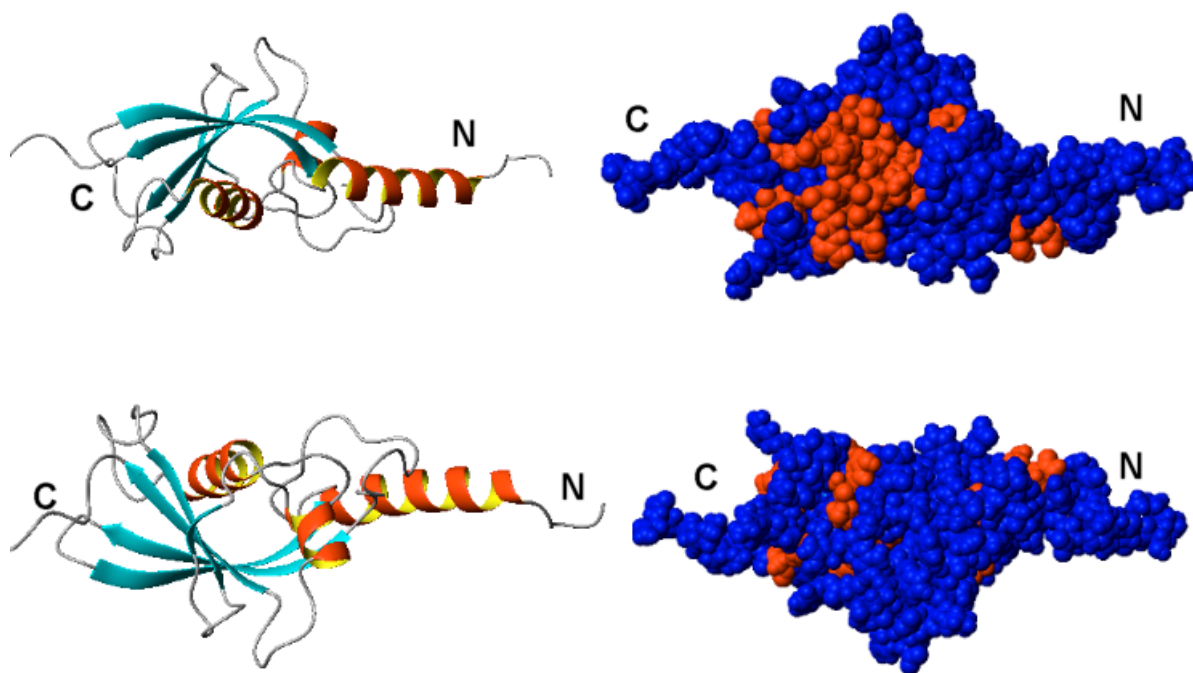


Abbildung 35: Quotienten der Signalamplituden von freiem AF6 zum entsprechenden Restsignal bei der Messung im gebundenen Zustand (nach G.Steiner). Der Mittelwert (durchgezogene Linie) liegt bei 1,61 und die zugehörige Standardabweichung (gestrichelte Linie) bei  $\pm 0,9$ .

Aus dem zweiten sichtbaren Effekt aus den Titrationsmessungen lassen sich Änderungen der Signalvolumina der von der Komplexbildung betroffenen Aminosäuren im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum anhand der Signale der Amidprotonen quantifizieren. Als besonders auffällig zeigten sich die Signale der Aminosäuren Ser31, Val42, Phe45, Phe 47, Gln48, Asp49, Ala56, Thr57, Lys58, Ile60, Arg61, Val62, Leu75, Ala76, Glu77, Lys78, Phe79, Arg80 und Asp82.



*Abbildung 36: Verteilung der in den Titrationsmessungen als signifikant aufgefallenen Aminosäuren auf dem AF6-Molekül (in rot). Die Struktur von AF6 wird in zwei verschiedenen Darstellungsweisen in zwei verschiedenen räumlichen Orientierungen gezeigt (Drehung entlang der x-Achse um 180°).*

Mit den Titrationsmessungen bietet die NMR eine Möglichkeit, diejenigen Veränderungen auf einem Molekül zu erfassen, die aus der Wechselwirkung mit einem anderen Bindungspartner resultieren. Bei der Interpretation des Ergebnisses muss allerdings berücksichtigt werden, dass zum Pool der von der Komplexbildung betroffenen Aminosäuren eines untersuchten Moleküls auch Residuen gehören, deren Effekt auf das NMR-Signal nicht direkt auf einer Beteiligung an der Interaktion beider Moleküle beruht, sondern auch durch konformationelle Änderungen des Moleküls zustande kommt. Da man nach einer Komplexstrukturberechnung eine möglichst genaue Vorstellung davon bekommen möchte, wie bzw. über welche Atome welcher Aminosäuren die beiden Interaktionspartner miteinander wechselwirken, braucht man eine definierte Bindungsstelle für jedes der interagierenden Moleküle. Neben einer für das Lösungsmittel Wasser zugänglichen Oberfläche (möglichst > 30 %) sollten die für die Strukturrechnung ausgewählten Aminosäuren eine möglichst zusammengehörende Region auf der Moleküloberfläche bilden.

Die Lageverteilung der in der Tabelle 10 aufgeführten Aminosäuren auf dem AF6-Molekül wurde bereits in Abbildung 36 gezeigt.

Aminosäure		Signifikanter		Oberflächen- zugänglichkeit in %	Struktur
		$\Delta$ chem. shift	$\Delta$ Vol		
Leu	25	X		2	L
Ser	31		X	28	L
Gln	32	X		19	L
Glu	38	X		7	L
Gly	41	X		1	B1
Val	42	X	X	16	B1
Phe	45		X	0	B1
Phe	47		X	16	B1
Gln	48		X	23	B1
Asp	49		X	11	L
Gly	53	X		21	L
Ala	56		X	10	B2
Thr	57		X	32	B2
Lys	58		X	5	B2
Ile	60	X	X	0	B2
Arg	61	X	X	13	B2
Val	62		X	0	B2
Leu	75		X	0	A2
Ala	76		X	1	A2
Glu	77		X	33	A2
Lys	78		X	30	A2
Phe	79		X	34	A2
Arg	80		X	33	L
Asp	82	X	X	4	L
Met	85	X		27	L
Tyr	91	X		28	B3
Ser	92	X		7	B3
Leu	93	X		0	B3
Tyr	94	X		12	B3

Tabelle 10: Übersicht über die für die Komplexbildung als signifikant eingestuftten Aminosäuren in AF6-RBD. Grundlage dieser Daten bilden die Titrationsmessungen. Die Oberflächenzugänglichkeit der aufgeführten Aminosäuren wurde mit dem Programm MOLMOL [Kor96] berechnet. Die Sekundärstrukturelemente sind farbig hinterlegt (ocker für  $\beta$ -Strang und blaugrün für  $\alpha$ -Helix).

Nachdem die auffälligen Aminosäuren in AF6 hinsichtlich ihrer Oberflächenzugänglichkeit für Lösungsmittel und ihrer Zugehörigkeit zu einem zusammengehörenden Bereich auf der Oberfläche des Moleküls beurteilt wurden, kann für die in Tabelle 11 aufgelisteten Aminosäuren eine wichtige Bedeutung bei der Interaktion mit Rap1A vermutet werden. Diese Aminosäureresiduen werden als bindungsaktiv für die Strukturrechnung mit HADDOCK [Dom03] definiert. Die Region um die bindungsaktiven Aminosäuren auf dem Molekül wird in

einem engen Bereich als bindungspassiv definiert. Diese Aminosäuren können ebenfalls an der Wechselwirkung der beiden Moleküle AF6 und Rap1A beteiligt sein.

Aminosäure	AS-Nr.	Strukturelement
His	19	A1
Asn	21	A1
Arg	24	L
Leu	25	L
Arg	44	B1
Asn	54	L
Thr	57	B2
Lys	58	B2
Cys	59	B2
Glu	77	A2
Lys	78	A2
Phe	79	A2
Arg	80	L
Asp	82	L
Arg	84	L

*Tabelle 11: Aminosäuren von AF6, die möglicherweise an der Rap1A-Bindung beteiligt sind. Die Sekundärstrukturelemente sind farbig hinterlegt (ocker für  $\beta$ -Strang und blaugrün für  $\alpha$ -Helix).*

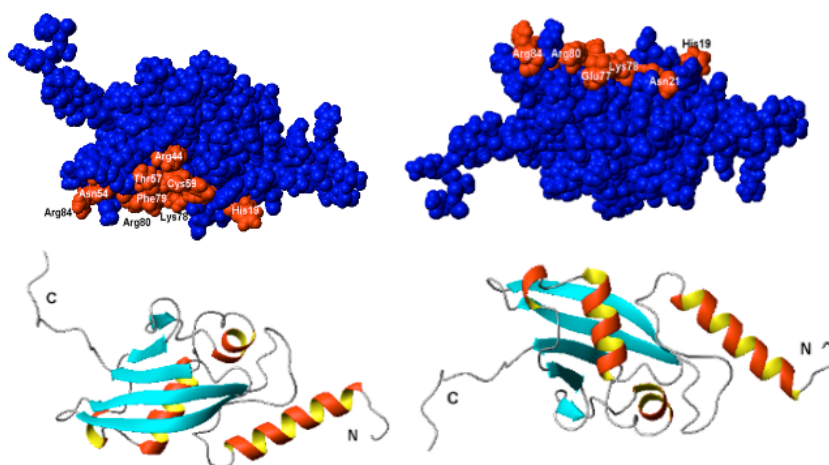
Die Aminosäuren His19, Asn21 und Arg24 wurden, obwohl sie in den Auswertungen der Titrationsmessungen nicht signifikant zu sein schienen, zusätzlich in die Liste der bindungsaktiven Aminosäuren in AF6 aufgenommen. Der Bereich der n-terminalen Helix in AF6, in dem diese drei zusätzlich eingeführten Residuen liegen, erfährt im Gegensatz zu der Komplexbildung von AF6 mit H-Ras bei der Bindung mit Rap1A deutliche Änderungen im Signalvolumen und Änderungen in den chemischen Verschiebungen. Zudem wurde in der noch nicht veröffentlichten Röntgenstruktur [Stie06] des Nore1-RBD•H-Ras-Komplexes gezeigt, dass die n-terminale Helix von Nore1-RBD eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung des Komplexes mit H-Ras hat. Dabei tritt die n-terminale Helix mit der Switch II-Region (AS 61-72) von H-Ras in Kontakt. Diese Information wurde bei der Berechnung der Komplexstruktur von AF6-RBD mit Rap1A durch HADDOCK [Dom03] berücksichtigt. Die Aminosäuren Arg84 und Asp82 wurden ebenfalls als bindungsaktiv definiert, weil sie die Bindungsoberfläche von AF6-RBD ergänzen. Die Daten der Mutationsanalysen von Prof. Dr. C. Herrmann wurden auch dieses Mal bei der Definition der AIRs berücksichtigt. Für den Komplex von AF6-RBD mit Rap1B (die Stabilitätsuntersuchungen des AF6•Rap-Komplexes



wurden mit Rap1B durchgeführt: s. Anhang) führt der Austausch R44A in AF6 zu einem Anstieg der  $K_D$  von 0,3 auf 4,2  $\mu\text{M}$ . Ein Austausch von K78A in AF6-RBD führt zu einer  $K_D$  von 5,2  $\mu\text{M}$ . Die mit diesen Aminosäuren durchgeführten Mutationsanalysen in AF6-RBD und die daraus resultierende Erhöhung der Dissoziationsrate des Komplexes bei R44A um das 14-fache und um das 17-fache beim erfolgten Residuen austausch K78A führt zu der Annahme, dass beide Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des AF6-RBD•Rap1A-Komplexes spielen. Das Asp54 in AF6 wurde dabei ebenfalls berücksichtigt, weil es dem Asn64 in Raf komplementär zu sein scheint <sup>4</sup>[Goh03]. Die in Tabelle 12 aufgeführten, zu Rap1A gehörigen Bindungspartner für die Aminosäuren Arg44, Asn54 und Lys58 von AF6-RBD werden in dieser Arbeit als komplementär für Arg44 zu den Aminosäuren Arg74 (Byr2-RBD) [Sche01], Arg59 (Raf), Arg16 (RalGDS) [Goh03] und für Asn54 von AF6 als komplementär zur Aminosäure Asn64 (Raf) [Goh03] und für Lys58 von AF6 als komplementär zum Lys101 (Byr2) [Sche01] eingestuft (s. Anhang). Folgende Aminosäurenpaare von AF6-RBD und Rap1A wurden mit einer eindeutigen Gewichtung in das Dockingprotokoll aufgenommen:

AF6-RBD	Rap1A
<b>Arg44</b>	<b>Glu37</b>
<b>Asn54</b>	<b>Arg41</b>
<b>Lys58</b>	<b>Asp38</b>

*Tabelle 12: Eindeutige Gewichtung dieser Aminosäurenpaare im Dockingprotokoll für AF6-RBD mit Rap1A.*



*Abbildung 37: Die definierte Interaktionsfläche von AF6 für die Komplexstrukturrechnung mit Rap1A. Die Struktur von AF6 ist hier in zwei unterschiedlichen Darstellungen in zwei verschiedenen Orientierungen (um 180 ° entlang der x-Achse gedreht) gezeigt (oben als*

<sup>4</sup> Asn64 von Raf interagiert mit Arg41 in Ras, Arg39 mit Glu37 in Ras [Goh03] und Lys101 (Byr) mit Asp38 (H-Ras) [Sche01]



*raumfüllendes und unten als Bändermodell). In der raumfüllenden Darstellung ist die Rap1A-Bindungsfläche von AF6 rot eingefärbt.*

Für Rap1A als den zweiten Bindungspartner für die Komplexstrukturrechnung mit HADDOCK gibt es keine aufgeklärte NMR-Struktur mit einem zugeordneten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum als Grundlage für Titrationsmessungen. Dennoch ließen sich aus der bekannten Röntgenstruktur des Komplexes zwischen Rap1A und der C-Raf1-Kinase (Code für die Proteindatenbank: 1C1Y) [RCBS] die nötigen Informationen für eine Strukturrechnung mit HADDOCK entnehmen. Die Bildung des C-Raf1•Rap1A-Komplexes erfolgt hauptsächlich durch die Interaktion der beiden intermolekularen antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter B2 von Rap1A und B2 der Ras-Bindedomäne C-Raf1. Die Bindungsfläche von Rap1A ist überwiegend positiv geladen und umfasst im C-Raf1•Rap1A-Komplex die Aminosäureresiduen 37-46. Für die Komplexstrukturrechnung des AF6-RBD•Rap1A-Komplexes wurden die beiden Regionen Switch I (Aminosäuren 30-45) und Switch II (Aminosäuren 60-72) als bindungsaktiv definiert. Die Switch I-Region in Rap1A soll demnach mit den Regionen der Sekundärstrukturelemente B1, B2 und A2 mit den sie verbindenden Loopregionen von AF6 wechselwirken, während die Switch II-Region in Rap1A mit den zur n-terminalen Helix gehörenden Residuen von AF6 (s. Tabelle 11) interagieren soll.

Rap1A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	M	R	E	Y	K	L	V	V	L	G	S	G	G	V	G	K	S	A	L	T	V	Q	F	V	Q	G	I	F	V	E	K	Y	D	P	T	I	E	D	S	Y
Rap1A	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	R	K	Q	V	E	V	D	C	Q	Q	C	M	L	E	I	L	D	T	A	G	I	F	Q	F	I	A	M	R	D	L	Y	M	K	N	G	Q	G	F	A	L
Rap1A	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
	V	Y	S	I	T	A	Q	S	T	F	N	D	L	Q	D	L	R	E	Q	I	L	R	V	K	D	T	E	D	V	P	M	I	L	V	G	N	K	C	D	L
Rap1A	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
	E	D	E	R	V	V	G	K	E	Q	G	Q	N	L	A	R	Q	W	C	N	C	A	F	L	E	S	S	A	K	S	S	K	I	N	V	N	E	I	F	Y
Rap1A	161	162	163	164	165	166	167																																	
	L	V	R	Q	I	N	R																																	

*Abbildung 38: Aminosäuresequenz von Rap1A. Farblich markiert sind die beiden Regionen in Rap1A, die für die Bindung mit AF6 eine wichtige Rolle spielen. Diese Sequenzbereiche werden in der Strukturrechnung mit HADDOCK als bindungsaktive Kontaktflächen des Moleküls berücksichtigt. (lachsfarben: Switch I-Region, grün: Switch II-Region).*

Die Struktur von Rap1A wie sie in Abbildung 39 dargestellt ist, bildet in ihrer Gpp(NH)p-gebundenen, aktiven Form neben der AF6-RBD die Eingangsstruktur für die Komplexstrukturberechnung mit dem Programm HADDOCK [Dom03].

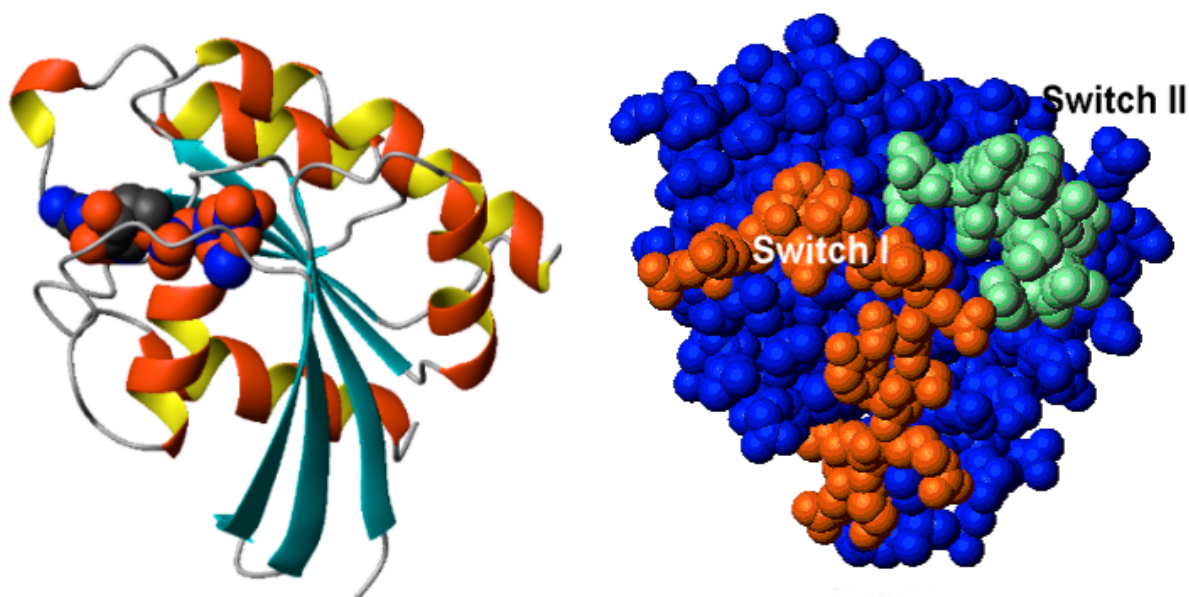
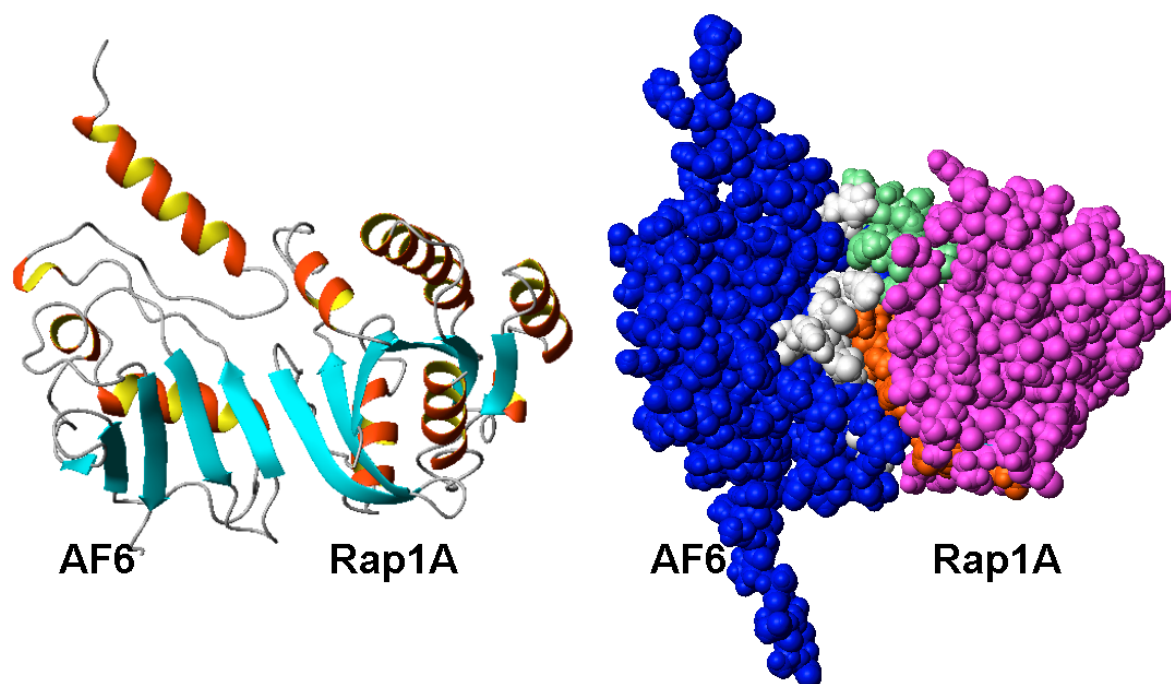


Abbildung 39: Das Rap1A-Molekül in zwei unterschiedlichen Darstellungen gleicher Orientierung. Linkes Bild: Rap1A in Ribbon-Darstellung mit gebundenem Gpp(NH)p (in raumfüllender Darstellung). Rechtes Bild: Rap1A in raumfüllender Darstellung (blau). Orangerot eingefärbt sind die Residuen der Switch I-Region, hellgrün gefärbt die Residuen der Switch II-Region. Diese Bereiche bilden die für die Wechselwirkung mit AF6 verantwortliche Oberflächenregion des Moleküls in der Strukturrechnung.

Das Strukturmodell des AF6•Rap1A-Komplexes wurde mit dem Moleküldynamikprogramm HADDOCK [Dom03] basierend auf der Röntgenstruktur des Komplexes von C-Raf1•Rap1A, der NMR-Lösungsstruktur von AF6-RBD und den Titrationsdaten erstellt.

Die nachstehende Analyse beruht auf den 100 Strukturen, die automatisch im Wasserkasten verfeinert wurden. Bei allen errechneten Komplexstrukturmodellen sind die Bindungsflächen von AF6 und Rap1A entsprechend der Vorgaben richtig orientiert. Die Komplexstrukturen ergeben deshalb ein einheitliches Bild davon, wie ein Komplex zwischen den beiden Molekülen aussehen könnte. AF6 bildet mit seiner  $\beta$ -Faltblattregion ein intermolekulares  $\beta$ -Faltblatt mit dem Faltblatt B2 von Rap1A aus. Der Komplex wird zusätzlich durch die Wechselwirkung des C-terminalen Bereiches der N-terminalen Helix A1 von AF6 zusammen mit der Switch II-Region von Rap1A stabilisiert.



*Abbildung 40: Der AF6•Rap1A-Komplex als Ergebnis der Komplexstrukturrechnung in zwei verschiedenen Darstellungen. In der raumfüllenden Darstellung (links) befindet sich die RBD von AF6 (blau) mit seinen in weiß gefärbten AIRs. Die aktiven AIRs in Rap1A (magenta) entsprechen den beiden Switch-Regionen I (in orangerot) und II (in hellgrün). Der Komplex ist ein durchschnittliches Strukturmodell aus den 100 in Wasser verfeinerten Strukturen.*

Die insgesamt 100 gerechneten und in der Wasserbox verfeinerten Komplexstrukturen wurden von HADDOCK durch eine anschließende Clusteranalyse in Ensembles von ähnlich bzw. gleich ausgerichteten Strukturvorstellungen untergliedert. Bleibt die Abweichung des RMSD-Wertes von mindestens vier Strukturen unter 1,5 Å, bilden diese zusammengehörende Strukturen ein Cluster.

Für die 100 gerechneten AF6•Rap1A-Komplexstrukturen konnten insgesamt 73 Strukturen vier verschiedenen Clustern zugeordnet werden. Im Cluster 1 sind 45 Strukturen vereint, Cluster 2 umfasst 13 ähnliche Strukturmodelle, während dem Cluster 3 mit 8 Strukturmodellen und dem Cluster 4 mit 7 Strukturen hinsichtlich der Anzahl der in ihnen vereinten Strukturvorstellungen keine aussagekräftige Bedeutung mehr zukommt.

Eine schnelle Übersicht über die Unterschiede der Strukturmodelle beider Cluster gibt der BSA-Wert und der Wert der intermolekularen Energien. Demnach ist die Interaktionsfläche der Moleküle im Cluster 2 geringfügig größer, verglichen mit dem Cluster 1. Der Wert für die  $E_{\text{inter}}$  ist in der durchschnittlichen Struktur des Clusters 2 zudem geringer, als in Cluster 1, was darauf hindeutet, dass die in Cluster 2 gerechneten Strukturmodelle stabiler sind.

	Cluster 1	Cluster 2
<b>Anzahl (Komplexstrukturen)</b>	45	13
<b>BSA (buried surface area)</b>	2295 ± 155	2369 ± 118
<b>Energien [kJ/mol]</b>		
<b>E<sub>inter</sub></b>	-2425 ± 205	-2582 ± 154
<b>E<sub>vdW</sub></b>	-393 ± 46	-407 ± 46
<b>E<sub>elec</sub></b>	-2212 ± 217	-2342 ± 129
<b>E<sub>air</sub></b>	179 ± 17	167 ± 12

Tabelle 13: Statistik der Energien und der verborgenen Oberfläche der beiden wechselwirkenden Moleküle. Die Werte entsprechen jeweils dem Durchschnittswert einer im entsprechenden Cluster enthaltenen Komplexstruktur.

Eine Analyse der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen AF6-RBD und Rap1A gibt Auskunft darüber, wie sich die beiden Cluster im Detail unterscheiden. Hierfür wurden die H-Kontaktlisten der Strukturen den beiden Clustern zugeordnet und anschließend die Anzahl für jeden benennbaren H-Kontakt aus der Zahl der Strukturen aus dem jeweiligen Cluster ermittelt. Die Quote der Kontakte bezieht sich prozentual auf die zum entsprechenden Cluster zählenden Strukturen.

AF6			Rap1A			Quote der Kontakte in % vom Cluster 1
AS-Nr.	AS	Atom	AS-Nr.	AS	Atom	
80	ARG	HH22	35	THR	OG1	67
79	PHE	O	40	TYR	HH	67
23	ASN	OD1	59	ALA	HN	53
59	CYS	HN	37	GLU	OE1	49
23	ASN	HD21	62	GLU	OE1	44
80	ARG	HH12	35	THR	OG1	40
21	ASN	O	63	GLN	HN	40
59	CYS	HN	37	GLU	OE2	38
54	ASN	OD1	41	ARG	HN	38
58	LYS	HZ1	37	GLU	O	36
77	GLU	OE2	31	LYS	HZ1	29
58	LYS	HZ2	38	ASP	OD1	29
58	LYS	HZ2	37	GLU	O	29
23	ASN	HD21	62	GLU	OE2	27
23	ASN	HD22	59	ALA	O	27
19	HIS	HE2	66	ALA	O	27
80	ARG	HE	33	ASP	OD2	24
80	ARG	HH21	40	TYR	OH	22
80	ARG	HH21	33	ASP	OD2	22
58	LYS	HZ1	38	ASP	OD1	22
57	THR	O	39	SER	HG	22
54	ASN	HD22	41	ARG	O	22

AF6			Rap1A			Quote der Kontakte in % vom Cluster 2
AS-Nr.	AS	Atom	AS-Nr.	AS	Atom	
80	ARG	HH22	35	THR	OG1	69
23	ASN	OD1	59	ALA	HN	69
59	CYS	HN	37	GLU	OE1	62
58	LYS	HZ2	38	ASP	OD1	46
58	LYS	HZ1	37	GLU	O	46
23	ASN	HD21	62	GLU	OE1	46
23	ASN	HD22	59	ALA	O	46
21	ASN	O	63	GLN	HN	46
79	PHE	O	40	TYR	HH	38
19	HIS	HE2	66	ALA	O	38

Tabelle 14: Übersicht über die intermolekularen H-Kontakte, die im entsprechenden Cluster auftreten. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind nach ihrer prozentualen Häufigkeit in den zum Cluster zählenden Komplexstrukturen aufgelistet.

Im Gegensatz zu den Daten aus den Titrationsmessungen von AF6 mit H-Ras zeigten die Spektren für die entsprechenden Werte bei der Titration von AF6 mit Rap1A im N-terminalen Bereich von AF6 Auffälligkeiten, die eine Beteiligung der N-terminalen Helix A1 von AF6 bei der Komplexbildung mit Rap1A nahelegen. Die Komplexstrukturrechnung mit HADDOCK hat gezeigt, dass sich der Komplex zwischen AF6-RBD und Rap1A durch eine Beteiligung bestimmter Residuen der N-terminalen Helix A1 von AF6 an der Wechselwirkung mit der Switch II-Region von Rap1A darstellen lässt. Es kann also angenommen werden, dass der AF6•Rap1A-Komplex nicht nur durch ein intermolekulares  $\beta$ -Faltblatt zustandekommt, sondern zusätzlich noch durch eine Wechselwirkung der N-terminalen Helix von AF6 mit der Switch II-Region stabilisiert wird.

## 4.5. Interaktion von AF6 unter gleichen Bedingungen für H-Ras und Rap1A

Im Abschnitt 4.4 wurde gezeigt, wie die RBD von AF6 mit den Ras-Molekülen H-Ras und Rap1A einen Komplex bildet. Das Dockingprogramm HADDOCK [Dom03] berechnete in einer Moleküldynamiksimulation die Vorstellung einer möglichen Komplexstruktur zwischen der RBD von AF6 mit H-Ras und Rap1A. Als Grundlage für die Komplexstrukturrechnung dienten für die RBD von AF6 die bereits in Abschnitt 4.4 erwähnten Titrationsmessungen. Als weitere Informationen für das Dockingprotokoll von AF6-RBD wurden für die Berechnung des Komplexes zwischen AF6-RBD und H-Ras die Daten aus den Mutationsanalysen von Prof. Dr. Christian Herrmann (s. Anhang) berücksichtigt (die Aminosäure Asn54). Zur Simulation des Komplexes zwischen AF6-RBD und Rap1A wurden als Eingangsdaten für das Dockingprotokoll nur die Ergebnisse aus den Titrationsmessungen herangezogen. Allerdings wurden neben den als signifikant ermittelten Aminosäuren von AF6-RBD zusätzlich noch die im Bereich der N-terminalen  $\alpha$ -Helix gelegenen Aminosäuren His19, Asn21 und Arg24 mit in das Dockingprotokoll aufgenommen, obwohl deren Quotienten aus den Intensitäten der Signalvolumina nicht den vorgeschriebenen Mittelwert plus einer Standardabweichung überschritten (s. Abbildung 35). Diese drei Aminosäuren sollten im Dockingprotokoll für den Komplex AF6•Rap1A berücksichtigt werden, weil sich gerade für den Bereich der N-terminalen  $\alpha$ -Helix in AF6-RBD die größten Unterschiede in den Quotienten aus den Signalvolumina ergaben. Ausnahmen im Dockingprotokoll wurden jeweils auch bei den anderen beiden Dockingpartnern von AF6-RBD, H-Ras und Rap1A berücksichtigt. In H-Ras wurde lediglich der Bereich der Switch I-Region für die Aminosäuren 32-44 als bindungsaktiv definiert, während die Aminosäuren 61-72 der Switch II-Region als bindungspassiv eingestuft wurden (s. Abbildung 31). Im Rap1A-Molekül wurden dagegen sowohl die Aminosäuren 30-45 der Switch I-Region als auch die Aminosäuren 60-72 der Switch II-Region als bindungsaktiv definiert.

Diese in Abschnitt 4.4 beschriebene Vorgehensweise für die Definition der einzelnen Aminosäurereste der in der Dockingsimulation untersuchten Moleküle sollte dem Vorschlag der Autoren Dominguez et. al. [Dom03] Rechnung tragen, dass alle verfügbaren Informationen über die Aminosäuren eines Moleküls, die zur Komplexbildung beitragen könnten, in die Dockingsimulation miteinfließen sollten.

In diesem neuen Ansatz einer weiteren Dockingsimulation für die Komplexe von AF6-RBD mit H-Ras und Rap1A sollte die Frage geklärt werden, wie das Programm HADDOCK in den untersuchten Fällen die beiden Dockingpartner zu einem Komplex zusammenführt, wenn die Moleküle H-Ras und Rap1A hinsichtlich ihrer definierten Bindungsoberfläche im Dockingprotokoll gleich behandelt werden. Für beide Dockingpartner von AF6-RBD – H-Ras und Rap1A – wurden jeweils dieselben Regionen als bindungsaktiv und bindungspassiv ausgewählt. Die Switch I-Region von H-Ras und Rap1A wurde für die Aminosäuren 32-44 in



deren Sequenzen als bindungsaktiv definiert, während die Switch II-Region für die Bereiche der Aminosäuren 61-72 in beiden Proteinen als bindungspassiv festgelegt wurde.

Für das Molekül AF6-RBD wurde in diesem neuen Experiment zur Festlegung des Dockingprotokolls ebenfalls ein rigides Verfahren angewendet, welches sich ausschließlich auf die Daten aus den Änderungen der Signalvolumina der Titrationsmessungen bezieht. Somit werden in diesem zweiten Dockingansatz keine Ausnahmen wie z.B. Daten aus den Mutationsanalysen von Prof. Dr. Christian Herrmann oder nicht signifikant erscheinende Aminosäurereste aus den Quotienten der Signalvolumina berücksichtigt.

Die Beweglichkeit der an der Komplexbildung beteiligten Regionen beider Dockingpartner wurde zur Berechnung der Molekülkomplexe AF6•H-Ras und AF6•Rap1A gleich behandelt: In AF6-RBD wurden die Regionen der Aminosäuren 39-48, 55-64 und 68-79 und die Aminosäuren von H-Ras und Rap1A für die Bereiche 30-45 und 58-72 im Proteinrückgrat starr gehalten, während die Seitenketten frei beweglich bleiben durften, um bei der Komplexbildung eine möglichst naturgetreue Zusammenlagerung der Interaktionspartner zuzulassen. Diese fünf Regionen der beiden Dockingpartner AF6/H-Ras oder AF6/Rap1A entsprechen den definierten Bindungsstellen der Moleküle. Zudem sollte eine mögliche Beteiligung der n-terminalen  $\alpha$ -Helix A1 und der darauffolgenden Loopregion von AF6-RBD an der Komplexbildung durch die uneingeschränkte Beweglichkeit des Rückgrats und der Seitenketten für den Aminosäurenbereich 7-31 einen möglichst naturgetreuen Wechselwirkungsprozess unterstützen. Es wird vermutet, dass die n-terminale  $\alpha$ -Helix A1 in AF6-RBD einen wichtigen Beitrag für die unterschiedlichen Werte der Dissoziationskonstanten von AF6•H-Ras und AF6•Rap1A leistet. Diese oben beschriebene Verfahrensweise bei der Definition der Beweglichkeiten von Proteinrückgrat und seinen Seitenketten sollte dieser Tatsache Rechnung tragen. Da sich herausstellte, dass als vollkommen beweglich definierte Region der Aminosäuren 7-131 in AF6-RBD durch die Strukturrechnung nicht erhalten werden konnte, wurden für diesen Bereich Beschränkungen zur Definition der Faltung dieser Region in Form von Diederwinkel, H-Brückenbindungen und räumlicher Abstände für die Moleküldynamiksimulation integriert.

#### 4.5.1. Dockingprotokoll und Resultate für den Komplex AF6•H-Ras

Im sogenannten Dockingprotokoll werden die Eingangsdaten für die Moleküldynamiksimulation mit dem Programm HADDOCK definiert. An erster Stelle steht die Festlegung der Interaktionsflächen beider Moleküle AF6 und H-Ras. Die Datenbasis für die Definition der Bindungsfläche von AF6 bildet dabei der Vergleich der Signalvolumina im AF6-Vergleichsspektrum von ungebundenem AF6 verglichen mit den Werten der Signalvolumina aus dem AF6•H-Ras-Spektrum. Der Quotient aus diesen beiden Signalvolumina für eine bestimmte Aminosäure von AF6 wird zur Analyse der Bindungsfläche in AF6 herangezogen.

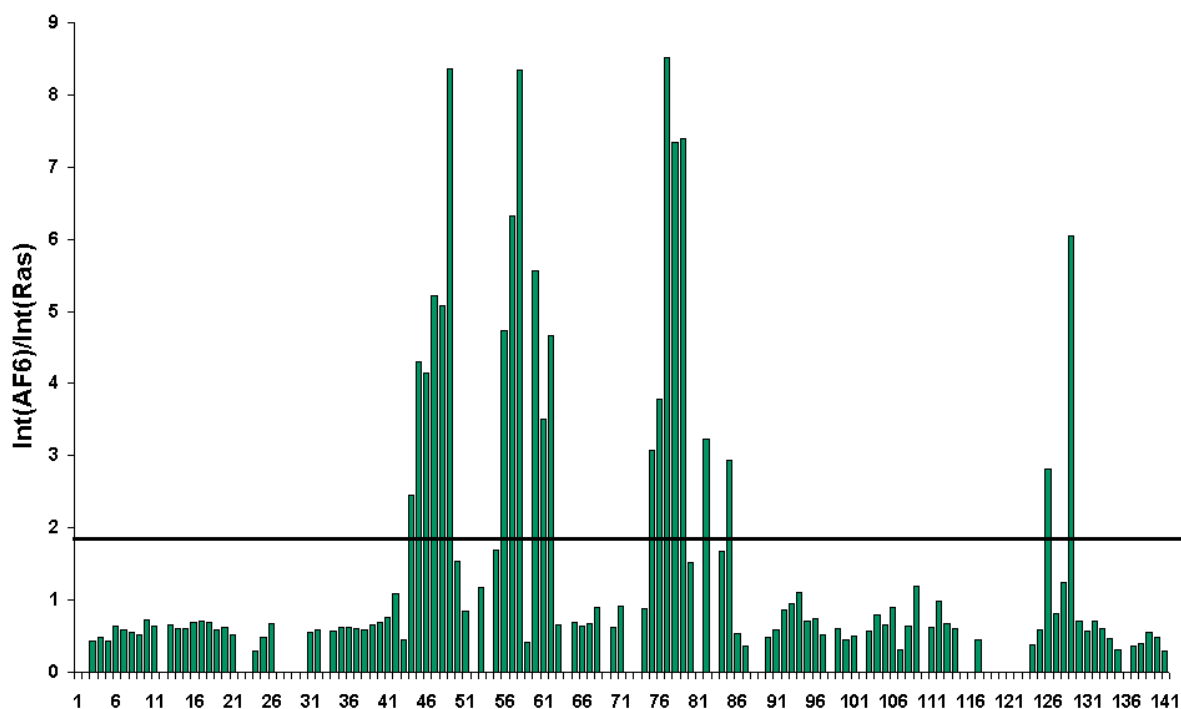


Abbildung 41: Quotient aus den Änderungen der Signalvolumina der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Kerne von AF6 durch die Komplexbildung mit H-Ras. Der schwarze Balken entspricht der einfachen Standardabweichung ( $\pm 1,95$ ). Sind die Änderungen bei den Volumina größer als die einfache Standardabweichung, gelten sie als signifikant.

Ist der Quotient der beiden Signalvolumina größer als die einfache Standardabweichung vom Nullwert, wird dies in dem hier neu angewendeten Verfahren als eine signifikante Änderung der Signalvolumina gewertet.


Die als signifikant eingestuft Aminosäuren von AF6 werden anschließend nach ihrer mit MOLMOL [Kor96] errechneten Oberflächenzugänglichkeit für Lösungsmittel selektiert. Ist deren Wert größer 20 %, wird die entsprechende Aminosäure als bindungsaktiv definiert, sofern sie mit den übrigen als aktiv definierten Aminosäuren eine nahezu zusammenhängende Region auf der Oberfläche des AF6-Moleküls bildet.



Aminosäure		Oberflächen- zugänglich in %	SE
Arg	44	36	B1
Phe	45	0	B1
Tyr	46	16	B1
Phe	47	4	B1
Gln	48	23	B1
Asp	49	11	B1
Ala	56	10	B2
Thr	57	33	B2
Lys	58	5	B2
Ile	60	0	B2
Arg	61	13	B2
Val	62	0	B2
Leu	75	0	A2
Ala	76	1	A2
Glu	77	34	A2
Lys	78	30	A2
Phe	79	34	A2
Asp	82	4	L
Met	85	27	L
Phe	126	1	B5
Lys	129	28	B5

ausgewählt nach 20%

Oberflächenzugänglichkeit



Aminosäure		SE
bindungsaktive AS		
Arg	44	B1
Thr	57	B2
Glu	77	A2
Lys	78	A2
Phe	79	A2
bindungspassive AS		
Asn	23	L
Leu	25	L
Asp	26	L
Phe	47	B1
Ala	56	B2
Lys	58	B2
Cys	59	B2
Glu	73	A2
Thr	74	A2
Arg	80	L
Leu	86	L
Gly	124	L
Arg	125	B5
Leu	128	B5

Tabelle 15: Die Tabelle zeigt links die signifikanten Aminosäuren von AF6 nach Signall volumina mit zugehöriger Oberflächenzugänglichkeit für das Lösungsmittel in %. Oben rechts sind die nach dem Auswahlverfahren verbleibenden Aminosäuren aufgelistet. Unten rechts sind die Aminosäuren aufgelistet, die nach HADDOCK-Definition [Dom03] als passive Aminosäuren in die Komplexstrukturrechnung eingehen. SE: Sekundärstrukturelement, B1:  $\beta$ -Faltblatt 1, B2:  $\beta$ -Faltblatt 2, B5:  $\beta$ -Faltblatt 5, A2:  $\alpha$ -Helix 2, L: Loopregion.

Die Aminosäuren Gln48, Met85, Phe126 und Lys129, die die Kriterien zur Einstufung als bindungsaktiver Aminosäurerest nach der Vorgabe der Oberflächenzugänglichkeit erfüllen, befinden sich nicht im Bereich der anderen als aktiv definierten Aminosäuren auf der Moleküloberfläche von AF6-RBD. Da diese nicht zur Bildung einer gemeinsamen Interaktionsfläche beitragen, wurden sie bei den Eingangsdaten für Komplexstrukturrechnungen nicht berücksichtigt.

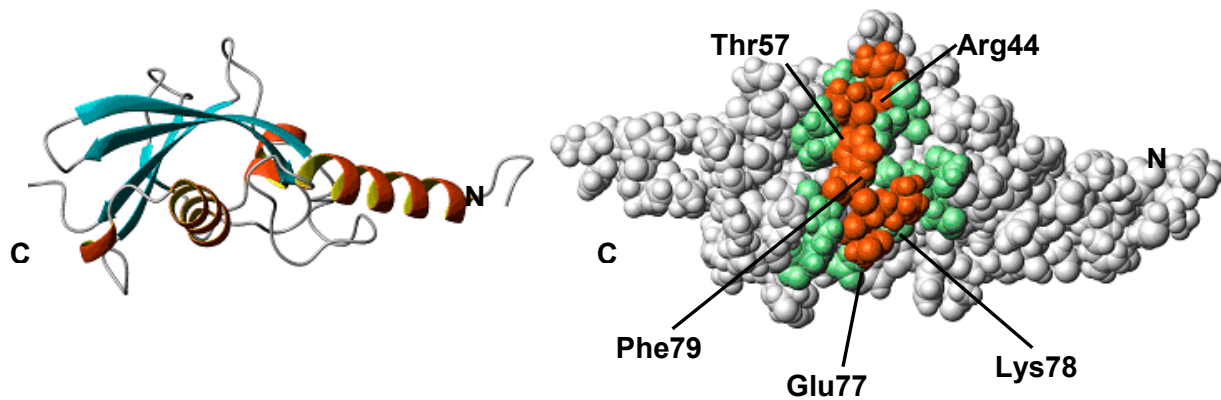


Abbildung 42: Links ist die Lage des Moleküls AF6 in der Ribbon-Darstellung gezeigt. Rechts ist das Molekül als raumfüllendes Modell in derselben Orientierung dargestellt. Orangerot gefärbt sind die bindungsaktiven Aminosäuren, die eine zusammenhängende Fläche bilden. Die passiven Aminosäurereste umsäumen die aktiven Residuen (blaßgrün gefärbt).

Für AF6-RBD konnte nun eine zusammenhängende Bindungsfläche für das Docking mit H-Ras definiert werden.

Die Definition der Bindungsfläche von H-Ras lehnt sich an die Erkenntnisse an, die sich aus den bereits bekannten Ras-Komplexen mit ihren Effektoren Byr2 [Scheff01], Raf und RalGDS [Goh03] ableiten lassen. In diesen Beispielen konnte gezeigt werden, dass vor allem die Aminosäuren in den Bereichen der Switch I-Region von H-Ras (AS 32-44) für die Interaktion mit dessen jeweiligem Effektor von größter Bedeutung waren. Zudem erfährt die Loopregion L4 oder besser bekannt als die sogenannte Switch II-Region von H-Ras (AS 61-72) mit der Bindung an einem Effektor eine strukturelle Änderung. Diese Informationen bilden die Grundlage zur Definition der Bindungsoberfläche. Die Switch I-Region soll demnach bei den Dockingsimulationen als bindungsaktiv und die Switch II-Region als bindungspassiv berücksichtigt werden. Die direkt an diese Regionen angrenzenden Aminosäurereste werden ebenfalls als bindungspassiv und damit mögliche Wechselwirkungspartner vorgeschlagen. Tabelle 16 listet die für die Dockingsimulation vorgeschlagenen Aminosäuren für das Molekül H-Ras auf.

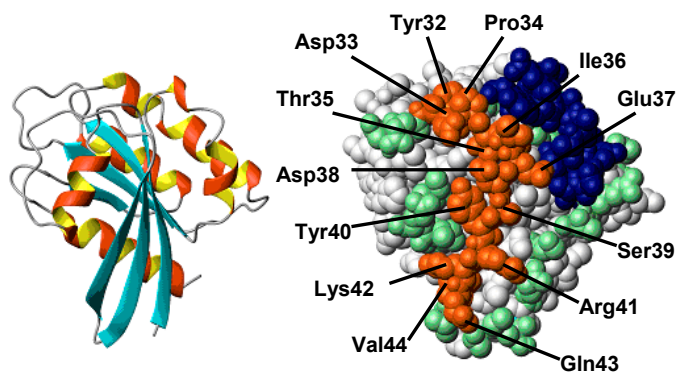
Aminosäuren der Switch I – Region (aktiv)	
Tyr	32
Asp	33
Pro	34
Thr	35
Ile	36
Glu	37
Asp	38
Ser	39
Tyr	40
Arg	41
Lys	42
Gln	43
Val	44

Aminosäuren der Switch II – Region (passiv)	
Gln	61
Glu	62
Glu	63
Tyr	64
Ser	65
Ala	66
Met	67
Arg	68
Asp	69
Gln	70
Tyr	71
Met	72

weitere Aminosäuren der Bindungsfläche (passiv)				
Met	1		Glu	31
Glu	3		Val	45
Lys	5		Thr	50
Gly	12		Arg	73
Ile	21		Thr	74
Leu	23		Gln	95
Ile	24		Tyr	96
Gln	25		Gln	99
Asp	30		Arg	102

*Tabelle 16: Alle Aminosäuren von H-Ras, die in der Dockingsimulation berücksichtigt werden. Die als bindungspassiv definierten Residuen werden entsprechend ihrer Zugehörigkeit zur Switch II-Region bzw. als räumliche Nachbarn der aktiven Bindungsoberfläche des Moleküls getrennt aufgelistet.*

In Abbildung 43 wird das Molekül H-Ras in der Ribbon-Darstellung gezeigt. Daneben soll ein raumfüllendes Molekülmodell die Lage der definierten Bindungsoberfläche auf H-Ras verdeutlichen. Die Moleküle sind in beiden Darstellungen räumlich gleich orientiert.



*Abbildung 43: Die Ribbon-Darstellung von H-Ras (links) zeigt die räumliche Orientierung beider Modelle in der Abbildung. Im raumfüllenden Modell von H-Ras ist die bindungsaktive Switch I-Region in Orangerot eingefärbt. Die bindungspassive Switch II-Region ist in Blau und Aminosäuren, die als passive Residuen die Bindungsregion umsäumen sind in Bläßgrün eingefärbt.*

Mit den in diesem Abschnitt vorgestellten Eingangsdaten wurden mit HADDOCK 100 Strukturen des AF6•H-Ras-Komplexes berechnet. Die gerechneten Strukturen wurden anschließend ihrer physiologischen Umgebung entsprechend in einer virtuellen wässrigen Lösung verfeinert.



*Abbildung 44: Der AF6•H-Ras-Komplex als Bändermodell. Die Darstellung zeigt, wie sich die beiden Moleküle AF6-RBD (links) und H-Ras (rechts) nach der Moleküldynamiksimulation zu einem Komplex zusammenlagern.*

Die Analyse des gerechneten Ensembles von Strukturen führte zur Identifikation von 5 Clustern, denen sich 78 der 100 gerechneten Strukturen zuordnen ließen. Die Tabelle 17 gibt einen Überblick über die drei größten Cluster geordnet nach der Anzahl der zugeordneten Komplexstrukturen. Die beiden übrigen Cluster, die aus der Clusteranalyse durch HADDOCK resultieren, wurden nicht in eine weitere Analyse mit einbezogen, da sie

aufgrund der geringen Anzahl der ihnen zugeordneten Strukturen nur begrenzte Aussagekraft besitzen.

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
<b>Anzahl (Komplexstrukturen)</b>	33	21	11
<b>BSA (buried surface area)</b>	1780 ± 70	1830 ± 55	1707 ± 97
<b>Energien [kJ/mol]</b>			
<b>E<sub>inter</sub></b>	11506 ± 506	25991 ± 11041	11865 ± 497
<b>E<sub>vdW</sub></b>	-104 ± 25	-158 ± 41	-129 ± 16
<b>E<sub>elec</sub></b>	-2543 ± 112	-2535 ± 179	-2456 ± 100
<b>E<sub>air</sub></b>	14154 ± 518	28681 ± 10957	14447 ± 481
<b>E<sub>cdih</sub></b>	1,26 ± 0,67	1,67 ± 3,77	0,41 ± 0,67

*Tabelle 17: Statistik der Energien und der durch die Komplexbildung entstandenden verborgenen Oberfläche der interagierenden Proteine aufgelistet nach den einzelnen Clustern.*

Die Analyse der Wasserstoffbrückenbindungen birgt nach einer Komplexstrukturrechnung den wertvollsten Informationsgehalt darüber, welche Aminosäuren der beiden Wechselwirkungspartner eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Komplexes spielen. Die folgende Tabelle listet - geordnet nach ihrer prozentualen Häufigkeit in den Strukturen eines Clusters - alle auftretenden H-Brückenbindungen, die in den Strukturen der drei vorgestellten Cluster vorkommen, auf.

Der Übersichtlichkeit wegen wird in der folgenden Tabelle die Beschriftung der Tabelle in einer Großansicht vorgestellt:

Cluster X						
AF6			H-Ras			prozentuale Häufigkeit der H-Bonds in den Strukturen von Cluster X
AS-NR.	AS-Typ	Atom	AS-NR.	AS-Typ	Atom	
80	Arg	HH21	38	Asp	OD2	100
usw.						

*Tabelle 18: Beispieltabelle mit der Beschriftung, auf die in der folgenden Tabelle (Tabelle 19) aus Platzgründen verzichtet wurde. Der blaugrün beschriftete Teil der Tabelle 18 fehlt in Tabelle 19, welche die intermolekularen H-Brücken der drei wichtigsten Cluster der Komplexstrukturen von AF6•H-Ras zusammenfasst.*

Cluster 1 (AF6•H-Ras)						
AF6-RBD			H-Ras			%
80	ARG	HH21	38	Asp	OD2	100
80	ARG	HH22	34	PRO	O	100
84	ARG	HH12	31	GLU	OE2	100
80	ARG	HE	38	ASP	OD1	96
44	ARG	HH22	43	GLN	OE1	94
54	ASN	OD1	26	ASN	HN	94
49	ASP	OD2	25	GLN	HE21	90
80	ARG	O	40	TYR	HH	85
80	ARG	HH12	34	PRO	O	75
54	ASN	HD22	26	ASN	O	72
80	ARG	HH12	33	ASP	OD2	72
44	ARG	HH12	43	GLN	OE1	67
80	ARG	HH11	33	ASP	OD1	67
78	LYS	O	39	SER	HN	63
78	LYS	HZ1	37	GLU	O	60
78	LYS	HZ3	37	GLU	OE1	57
78	LYS	HZ2	39	SER	OG	51
23	ASN	OD1	5	LYS	HZ3	45
24	ARG	HH12	3	GLU	OE1	45
78	LYS	HZ3	37	GLU	OE2	45
24	ARG	HH22	3	GLU	OE1	42
78	LYS	O	39	SER	HG	33
80	ARG	HH12	33	ASP	OD1	33
80	ARG	HH11	33	ASP	OD2	30
24	ARG	HE	3	GLU	OE1	27
24	ARG	HH21	3	GLU	OE2	27
78	LYS	HZ1	37	GLU	OE2	27
57	THR	O	43	GLN	HE22	24

Cluster 2 (AF6•H-Ras)						
AF6-RBD			H-Ras			%
78	LYS	O	39	SER	HN	100
80	ARG	HH21	38	ASP	OD2	100
80	ARG	HH22	34	PRO	O	100
80	ARG	O	40	TYR	HH	100
57	THR	O	41	ARG	HH21	71
78	LYS	O	39	SER	HG	66
24	ARG	HH22	3	GLU	OE1	61
54	ASN	OD1	42	LYS	HZ1	61
80	ARG	HH21	38	ASP	OD1	61
84	ARG	HN	33	ASP	OD2	61
78	LYS	HZ1	37	GLU	O	42
24	ARG	HH22	3	GLU	OE2	38
57	THR	O	41	ARG	HE	38
78	LYS	HZ3	37	GLU	OE1	38
80	ARG	HH11	33	ASP	OD2	38
80	ARG	HH12	34	PRO	O	38
58	LYS	HZ2	54	ASP	OD1	33
58	LYS	HZ2	54	ASP	OD2	33
78	LYS	HZ1	37	GLU	OE2	33
84	ARG	HH22	31	GLU	OE1	33
54	ASN	HD22	24	ILE	O	28
58	LYS	HZ1	54	ASP	OD2	28
58	LYS	HZ3	54	ASP	OD1	28
58	LYS	HZ2	39	SER	OG	28
78	LYS	HZ1	37	GLU	OE1	28
78	LYS	HZ2	37	GLU	O	28
78	LYS	HZ2	37	GLU	OE1	28
80	ARG	HE	38	ASP	OD1	28
80	ARG	HH12	33	ASP	OD1	28
58	LYS	HZ1	54	ASP	OD1	23

Cluster 3 (AF6•H-Ras)						
AF6-RBD			H-Ras			%
57	THR	O	41	ARG	HE	100
78	LYS	O	39	SER	HN	100
80	ARG	HH22	34	PRO	O	100
80	ARG	O	40	TYR	HH	100
80	ARG	HH12	34	PRO	O	90
80	ARG	HH11	33	ASP	OD2	81
80	ARG	HH21	38	ASP	OD2	81
54	ASN	OD1	42	LYS	HZ3	63
80	ARG	HH12	33	ASP	OD1	63
80	ARG	HH21	38	ASP	OD1	63
57	THR	O	41	ARG	HH21	54
78	LYS	HZ1	37	GLU	OE1	54
80	ARG	HE	38	ASP	OD1	54
84	ARG	HE	31	GLU	OE1	54
78	LYS	HZ1	37	GLU	OE2	45
78	LYS	O	39	SER	HG	45
80	ARG	HE	38	ASP	OD2	45
58	LYS	HZ3	54	ASP	OD2	36

Tabelle 19: Übersicht der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen mit Angabe der prozentualen Häufigkeit in den Komplexstrukturen der einzelnen Cluster. Farbig unterlegt oder markiert sind gleiche H-Brückenbindungen, die in verschiedenen Clustern auftreten.

Die in Tabelle 19 dargestellten Kontakte zeigen, dass sich die intermolekularen H-Brückenbindungen in den Komplexstrukturen aller drei Cluster sehr ähnlich sind. Es lassen

sich beim Abgleich aller Wasserstoffbrückenbindungen der drei Cluster sieben vollkommen identische intermolekulare Kontakte ausmachen (s. Abschnitt 7.4), was für eine hohe Konvergenz der Strukturen in den Clustern spricht.

#### 4.5.2. Dockingprotokoll und Resultate für den Komplex AF6•Rap1A

Die Berechnung des Komplexes zwischen AF6-RBD und Rap1A folgt im wesentlichen den in Abschnitt 4.5.1 beschriebenen Schritten. Der einzige Unterschied zwischen beiden Komplexstrukturberechnungen besteht in der Auswahl der bindungsaktiven Residuen von AF6-RBD. Grundlage für die Auswahl der Aminosäuren, die für eine Wechselwirkungsfläche in AF6 in Frage kommen, ist der Quotient der beiden Signalvolumina von freiem AF6 zum entsprechenden Restsignal im mit Rap1A gebundenem Zustand. Wie im vorherigen Abschnitt wird eine Aminosäure dann als signifikant für eine mögliche Bindungsaktivität mit Rap1A eingestuft, wenn deren Quotient größer als eine Standardabweichung ausgehend vom Nullwert ist.

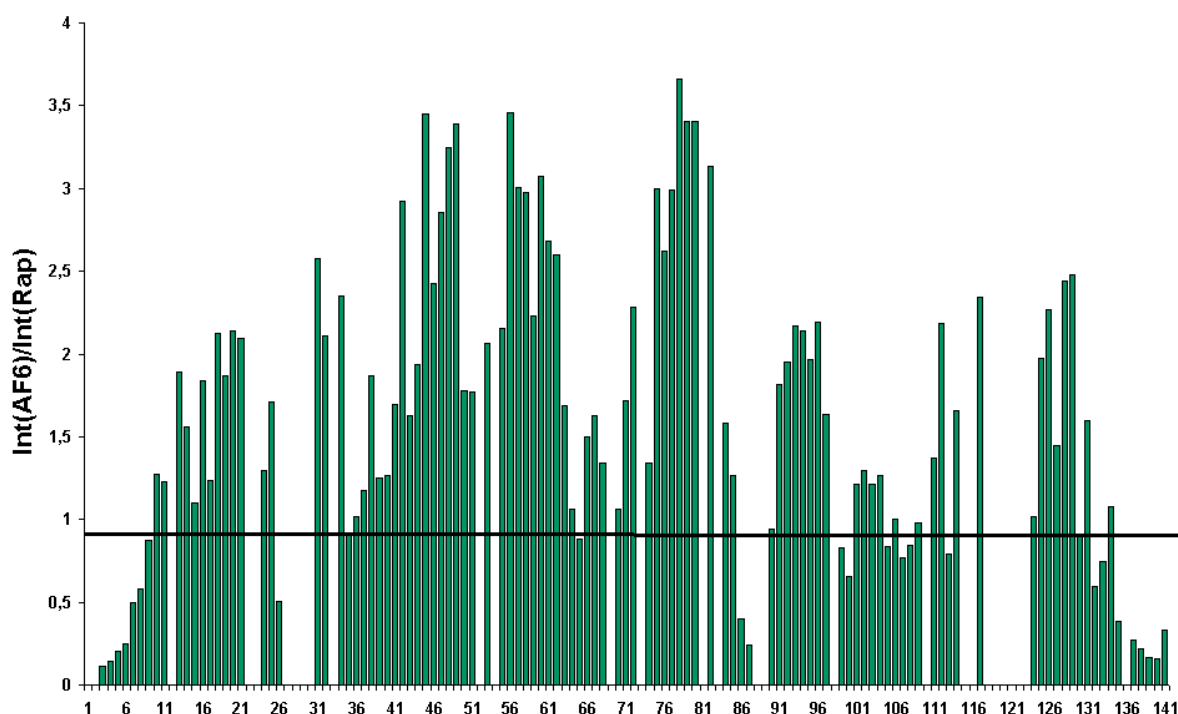


Abbildung 45: Quotient aus den Änderungen der Signalvolumina der  $H^N$ -Kerne von AF6 durch die Komplexbildung mit Rap1A. Der schwarze Balken entspricht der einfachen Standardabweichung ( $\pm 0,9$ ). Sind die Änderungen bei den Volumina größer als die einfache Standardabweichung, werden sie als signifikant gewertet.

Bei der Wechselwirkung von AF6-RBD mit Rap1A ergibt sich ein anderes Bild als bei der Interaktion mit H-Ras. Der deutlichste Unterschied besteht in einer möglichen Beteiligung von Aminosäuren, die im Bereich der N-terminalen Helix (AS 6-21) und der darauffolgenden Loopregion L1 lokalisiert sind. Es wird vermutet, dass die N-terminale Helix und die darauffolgende Loopregion einen Beitrag zur Stabilität des AF6•Rap1A-Komplexes leisten, was die deutlich niedrigere Dissoziationskonstante des Komplexes im Vergleich zu AF6•H-Ras erklären würde.



Aminosäure		Oberflächen- zugänglich in %	SE
Arg	10	23	A1
Arg	11	34	A1
Leu	13	4	A1
Ala	14	11	A1
Asp	15	38	A1
Ile	16	24	A1
Ile	17	1	A1
His	18	45	A1
His	19	46	A1
Trp	20	32	A1
Asn	21	3	A1
Arg	24	19	L
Leu	25	2	L
Ser	31	28	L
Gln	32	19	L
Thr	34	35	L
Asp	36	27	L
Leu	37	30	L
Glu	38	7	L
Phe	39	21	L
His	40	3	L
Gly	41	1	B1
Val	42	16	B1
Met	43	0	B1
Arg	44	36	B1
Phe	45	0	B1
Tyr	46	16	B1
Phe	47	4	B1
Gln	48	23	B1
Asp	49	11	B1
Lys	50	33	L
Ala	51	17	L
Gly	53	22	L
Phe	55	49	B2
Arg	102	28	L
Arg	103	33	B4

Aminosäure		Oberflächen- zugänglich in %	SE
Ala	56	10	B2
Thr	57	33	
Lys	58	5	B2
Cys	59	29	B2
Ile	60	0	B2
Arg	61	13	B2
Val	62	0	B2
Ser	63	0	L
Ser	64	7	L
Ala	66	0	L
Thr	67	4	L
Thr	68	0	A2
Asp	70	6	A2
Val	71	0	A2
Ile	72	0	A2
Thr	74	6	A2
Leu	75	0	A2
Ala	76	1	A2
Glu	77	34	A2
Lys	78	30	A2
Phe	79	34	A2
Arg	80	33	L
Asp	82	4	L
Arg	84	64	L
Met	85	27	L
Lys	90	38	L
Tyr	91	28	B3
Ser	92	7	B3
Leu	93	0	B3
Tyr	94	12	B3
Glu	95	2	B3
Val	96	21	L
His	97	6	L
Glu	101	31	L
Gly	124	8	L
Arg	125	13	B5

Leu	104	39	B4
Ile	106	13	L
Lys	109	1	L
Leu	111	0	A3
Val	112	8	A3
Gln	114	23	A3
Trp	117	48	A3

Phe	126	1	B5
Val	127	0	B5
Leu	128	1	B5
Lys	129	8	B5
Glu	131	12	L
Ala	134	38	L

*Tabelle 20: Liste aller Aminosäuren in AF6-RBD, die für eine Wechselwirkung mit Rap1A als signifikant eingestuft werden.*

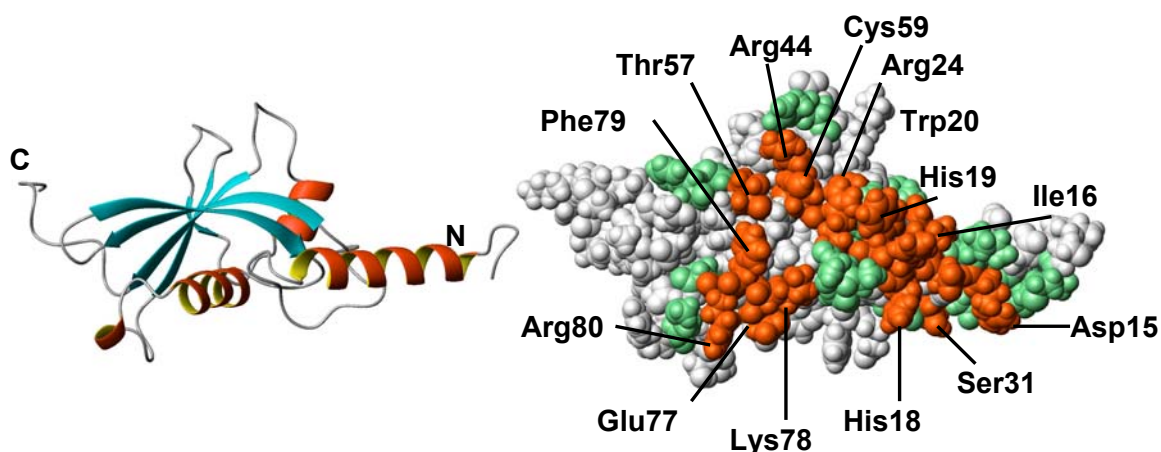
Aminosäuren in AF6, die sich als signifikant erweisen, werden nach ihrer Oberflächenzugänglichkeit für Lösungsmittel selektiert. Ist der Wert für die Oberflächenzugänglichkeit einer Aminosäure größer 20 % und befindet sich dieser Rest in einer nahezu zusammenhängenden Region auf der Oberfläche des AF6-Moleküls, wird er dem Programm HADDOCK als bindungsaktiv "vorgeschlagen".

aktive Residuen		
Aminosäure		SE
Arg	11	A1
Asp	15	A1
Ile	16	A1
His	18	A1
His	19	A1
Trp	20	A1
Arg	24	L
Ser	31	L
Phe	39	L
Val	42	B1
Arg	44	B1
Thr	57	B2
Cys	59	B2
Glu	77	A2
Lys	78	A2
Phe	79	L
Arg	80	L

passive Residuen		
Aminosäure		SE
Met	1	L
Asp	7	A1
Lys	12	A1
Ala	22	L
Asn	23	L
Asp	26	L
Ile	30	L
Gln	32	L
Tyr	46	B1
Phe	55	B2
Arg	61	B2
Pro	81	L
Met	83	L
Leu	115	A3
Arg	122	L

*Tabelle 21: Liste der aktiven und passiven Residuen von AF6-RBD.*

Vergleicht man die Auswahl der Aminosäuren in AF6, die lt. Tabelle 21 bei der Komplexbildung mit Rap1A eine signifikante Volumenänderung erfahren, mit den Aminosäureresten, die lt. Tabelle 20 als aktive Residuen von AF6 für die Dockingsimulation mit HADDOCK vorgeschlagen werden, fällt auf, dass nicht alle Residuen, die die oben erwähnten Kriterien der Oberflächenzugänglichkeit und der signifikanten Volumenänderung erfüllen, für eine Definition der Bindungsfläche in Frage kommen. Folgenden Aminosäuren konnten bei der Auswahl für die Bindungsfläche von AF6 nicht berücksichtigt werden: Arg10, Arg11, Thr34, Asp36, Leu37, Gln48, Lys50, Gly53, Phe55, Phe79, Arg84, Met85, Lys90, Tyr91, Val96, Arg102, Arg103, Leu104, Gln114, Trp117 und Ala134. Diese in der Tabelle 14 nicht berücksichtigten Aminosäuren liegen entweder auf der der Bindungsfläche abgewandten Seite des AF6-Moleküls verstreut, oder sie liegen von der Bindungsfläche beider Moleküle im bereits gerechneten Komplex von Abschnitt 4.4.2 zu weit entfernt, so dass deren Beteiligung an einer Komplexbildung ausgeschlossen werden kann.



*Abbildung 46: Die räumliche Orientierung des Moleküls AF6 ist in der Abbildung links als Ribbon-Modell dargestellt. Die Abbildung rechts zeigt AF6 als raumfüllendes Modell mit seiner Bindungsfläche unterteilt in aktive (orangerot) und passive (blaßgrün) Aminosäuren.*

Die Definition der Bindungsfläche von Rap1A folgt dem gleichen Verfahren, das für die Wechselwirkungsfläche von H-Ras angewandt wurde (s. Abschnitt 4.5.1). Nachfolgende Tabelle soll die Festlegung der Interaktionsfläche von Rap1A für die Komplexstrukturrechnung von AF6•Rap1A beschreiben. Wieder wurde die Switch I-Region von Rap1A als bindungsaktiv definiert, während die Switch II-Region passiv an einer Bindung mit AF6 beteiligt sein kann. Die gesamte Bindungsfläche von Rap1A wird von passiven Residuen umsäumt.

Aminosäuren der Switch I – Region (aktiv)		Aminosäuren der Switch II – Region (passiv)	
Tyr	32	Thr	61
Asp	33	Glu	62
Pro	34	Gln	63
Thr	35	Phe	64
Ile	36	Thr	65
Glu	37	Ala	66
Asp	38	Met	67
Ser	39	Arg	68
Tyr	40	Asp	69
Arg	41	Leu	70
Lys	42	Tyr	71
Gln	43	Met	72
Val	44		

weitere Aminosäuren der Bindungsfläche (passiv)			
Met	1	Gln	50
Glu	3	Glu	54
Lys	5	Lys	73
Val	21	Asn	74
Val	24	Asp	95
Gln	25	Leu	96
Glu	30	Gln	99
Lys	31	Arg	102
Glu	45		

*Tabelle 22: Aminosäuren in Rap1A, welche die Bindungsoberfläche des Moleküls definieren. Die Reste der Switch I-Region werden aus Gründen der Übersichtlichkeit gesondert aufgelistet.*

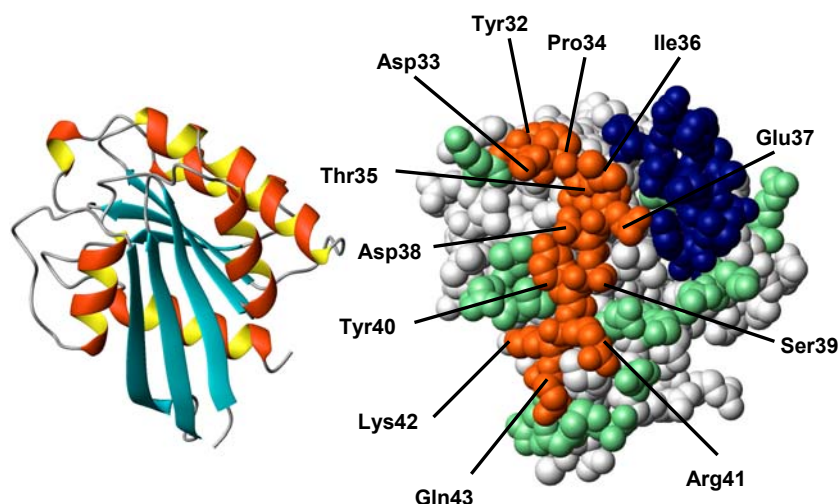


Abbildung 47: Das Rap1A-Molekül ist in beiden Darstellungen in derselben räumlichen Orientierung gezeigt. Im rechten Modell ist die Interaktionsfläche von Rap1A für AF6-RBD farblich markiert. (Switch I-Region: orangerot, Switch II-Region: blau, Aminosäuren, die die Bindungsregion ergänzen sind blaßgrün).

Mit den bisher vorgestellten Eingangsdaten für die anschließende Komplexstrukturrechnung mit HADDOCK wurden 100 Strukturen des AF6•Rap1A-Komplexes erzeugt, von denen insgesamt 34 Strukturen den vier von HADDOCK ermittelten Clustern zugeordnet werden können.

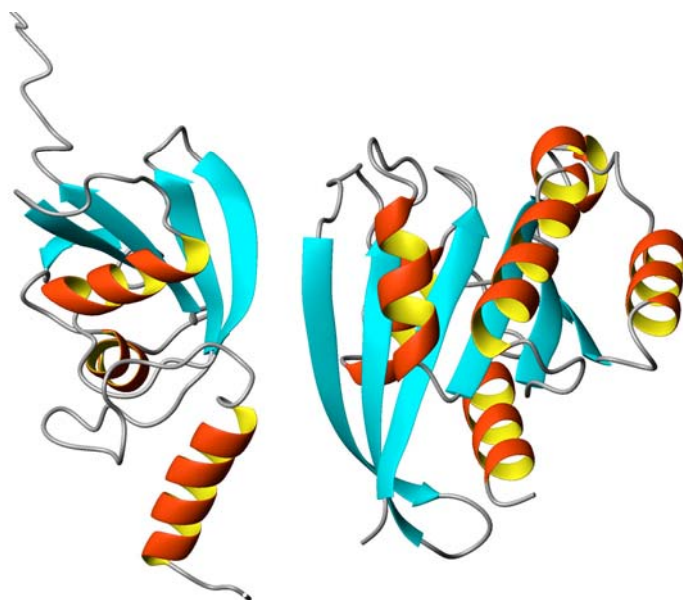


Abbildung 48: Dieses Bändermodell zeigt den durchschnittlichen AF6•Rap1A-Komplex, der sich aus dem Ensemble der 100 Strukturvorstellungen ergibt, die von HADDOCK errechnet wurden.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die drei wichtigsten Cluster. Dargestellt sind die Mittelwerte der Energien ihrer Strukturen mit zugehöriger Standardabweichung und die verborgene Oberfläche, die einen Hinweis auf die Größe der Kontaktfläche beider interagierenden Moleküle liefert.

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
<b>Anzahl (Komplexstrukturen)</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>6</b>
<b>BSA (buried surface area)</b>	<b><math>1567 \pm 97</math></b>	<b><math>1733 \pm 156</math></b>	<b><math>1689 \pm 91</math></b>
<b>Energien [kJ/mol]</b>			
<b><math>E_{\text{inter}}</math></b>	<b><math>41534 \pm 543</math></b>	<b><math>38404 \pm 1087</math></b>	<b><math>38404 \pm 606</math></b>
<b><math>E_{\text{vdW}}</math></b>	<b><math>-150 \pm 25</math></b>	<b><math>-112 \pm 33</math></b>	<b><math>-117 \pm 16</math></b>
<b><math>E_{\text{elec}}</math></b>	<b><math>-2204 \pm 112</math></b>	<b><math>-2439 \pm 217</math></b>	<b><math>-2313 \pm 288</math></b>
<b><math>E_{\text{air}}</math></b>	<b><math>43894 \pm 514</math></b>	<b><math>40957 \pm 928</math></b>	<b><math>40835 \pm 531</math></b>

*Tabelle 23: Statistik der Energien und der BSA mit den Mittelwerten und den zugehörigen Standardabweichungen errechnet aus den Energiewerten der einzelnen Strukturvorstellungen der Strukturen eines Clusters.*

Beim Vergleich der Gesamtenergien  $E_{\text{inter}}$  aller drei Komplexe fällt auf, dass sowohl die einzelnen Energiebeiträge zur Gesamtenergie und somit auch der Wert der Gesamtenergie der Strukturen in den einzelnen Cluster recht ähnlich sind.

Interessant wird nun das Ergebnis aus der Analyse der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. Lassen sich die sehr ähnlichen Energiewerte der einzelnen Cluster darauf zurückführen, dass sich die beiden Interaktionspartner AF6-RBD und Rap1A in den Strukturen der einzelnen Cluster in ähnlicher Weise zu einem Komplex zusammenfinden und zu deren Stabilisierung in der Mehrzahl die gleichen H-Brückenbindungen beitragen?

Cluster 1 (AF6•Rap1A)						
AF6-RBD			Rap1A			%
125	ARG	HH21	33	ASP	OD1	75
44	ARG	HE	40	TYR	OH	67
57	THR	HG1	38	ASP	OD1	67
57	THR	HN	37	GLU	O	67
44	ARG	HH12	33	ASP	OD2	58
46	TYR	HH	34	PRO	O	58
57	THR	HG1	38	ASP	OD2	58
57	THR	OG1	40	TYR	HH	58
122	ARG	HH12	30	GLU	OE1	58
122	ARG	HH22	30	GLU	OE1	58
55	PHE	O	36	ILE	HN	50
122	ARG	HH22	28	PHE	O	50
125	ARG	HH21	33	ASP	OD2	50
44	ARG	HH12	33	ASP	OD1	42
44	ARG	HH21	40	TYR	OH	42
44	ARG	HH22	33	ASP	OD2	42
58	LYS	HZ1	37	GLU	OE1	42
122	ARG	HH22	30	GLU	OE2	42
58	LYS	HZ2	37	GLU	OE1	33
58	LYS	HZ3	39	SER	OG	33
59	CYS	HG	39	SER	O	33
61	ARG	HH21	41	ARG	O	33

Cluster 2 (AF6•Rap1A)						
AF6-RBD			Rap1A			%
61	ARG	HH11	37	GLU	OE2	100
120	ASP	O	31	LYS	HZ3	100
121	ASP	OD1	31	LYS	HZ2	100
44	ARG	HH22	62	GLU	OE1	91
24	ARG	HH22	37	GLU	OE1	82
44	ARG	HH12	62	GLU	OE1	82
44	ARG	HH12	62	GLU	OE2	82
59	CYS	HG	62	GLU	OE2	82
24	ARG	HH12	37	GLU	OE1	73
44	ARG	HH21	35	THR	O	73
61	ARG	HH22	38	ASP	OD1	73
123	GLU	HN	33	ASP	OD1	73
40	HIS	HE2	38	ASP	OD1	64
57	THR	HG1	63	GLN	OE1	55
61	ARG	HH12	38	ASP	OD1	55
61	ARG	HH22	38	ASP	OD2	45
123	GLU	HN	33	ASP	OD2	45
61	ARG	HH12	38	ASP	OD2	36

Cluster 3 (AF6•Rap1A)						
AF6-RBD			Rap1A			%
61	ARG	HH11	37	GLU	OE2	100
61	ARG	HH12	38	ASP	OD2	100
24	ARG	HH12	37	GLU	OE1	83
44	ARG	HH12	62	GLU	OE1	83
44	ARG	HH21	35	THR	O	83
57	THR	HN	63	GLN	OE1	83
61	ARG	HH22	38	ASP	OD2	83
120	ASP	O	31	LYS	HZ3	83
121	ASP	OD1	31	LYS	HZ2	83
123	GLU	HN	33	ASP	OD2	83
40	HIS	HE2	38	ASP	OD2	67
44	ARG	HE	35	THR	O	67
57	THR	HG1	63	GLN	OE1	67
59	CYS	HG	62	GLU	OE1	67
61	ARG	HH22	38	ASP	OD1	67
44	ARG	HH12	62	GLU	OE2	50
44	ARG	HH22	62	GLU	OE2	50
57	THR	O	63	GLN	HE22	50
121	ASP	OD2	31	LYS	HZ2	50
123	GLU	HN	33	ASP	OD1	50
44	ARG	HH22	62	GLU	OE1	33

*Tabelle 24: Die Tabelle zeigt Art und Häufigkeit der auftretenden intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen in den Komplexstrukturen der einzelnen Cluster in Prozent. Farbiger unterlegt oder markiert sind gleiche H-Brückenbindungen, die in den verschiedenen Clustern auftreten.*

Ein Abgleich der Kontaktlisten der drei Cluster zeigt, dass keiner der Kontakte aus den Komplexstrukturen von Cluster 1 in den anderen beiden Clustern zu finden ist. In Cluster 2 und 3 finden sich 13 identische H-Brückenkontakte. Man darf davon ausgehen, dass die Strukturen dieser beiden Cluster sehr stark zu einer gemeinsamen mittleren Struktur konvergieren (vgl. Abschnitt 7.4).



## 5. Strukturverfeinerung der RBD von Byr2

### 5.1. NMR-Struktur der Byr2-RBD vor der Strukturverfeinerung

Für die bereits veröffentlichte NMR-Struktur von Byr2 nach Gronwald et al. [Hub01] konnten durch entsprechende homo- und heteronukleare NMR-Experimente insgesamt 824 NOE-Abstandsbeschränkungen ermittelt werden, die für abschließende Strukturrechnungen herangezogen wurden. Trotz dieser relativ geringen Zahl an sicher zuordenbaren NOEs konnte Huber (2001) durch Hinzuziehen von 39 dipolaren Kopplungen [Gro00] und 29 Wasserstoffbrückenbindungen in der  $\beta$ -Faltblattregion eine gut definierte NMR-Struktur berechnen. Man muss sich dennoch im Klaren sein, dass das Ergebnis einer Strukturrechnung lediglich eine Strukturvorstellung aus vielen Möglichkeiten liefert. Entsprechen viele der gerechneten Strukturvorstellungen einander, so dass sie sich beim Übereinanderlagern im wesentlichen ähneln, spricht man von einer konvergierenden Struktur. Je mehr Abstandsbeschränkungen für die Strukturrechnung zur Verfügung stehen, desto wahrscheinlicher konvergieren die errechneten Strukturen zu einer konkreten Strukturvorstellung. Das heißt auch, dass mit zunehmender Anzahl von Distanzbeschränkungen für die Strukturrechnung die Zahl möglicher Strukturvorstellungen abnimmt und so ein genaueres Bild der "mittleren" Struktur eines Moleküls zurückgegeben wird.

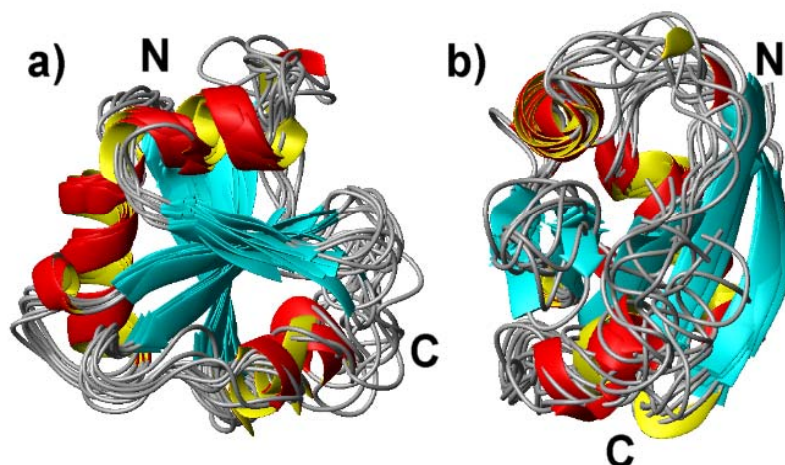


Abbildung 49: Darstellung eines Byr2-Strukturbündels in zwei verschiedenen Orientierungen (a und b). Dabei wurden aus 1000 gerechneten Strukturen jeweils die 10 besten Strukturen übereinandergelagert.

Abbildung 49 a und b zeigen eine Darstellung des Moleküls von den Aminosäureresiduen 1-95 im Bändermodell. Deutlich zu erkennen sind die übereinandergelagerten Sekundärstrukturelemente und besonderes das fünfsträngige gemischte  $\beta$ -Faltblatt. Während die Helix H1 noch relativ gut definiert ist, geben die Überlagerungen der Helices H2 und H3 eine weniger deutlichere Strukturierung wieder.

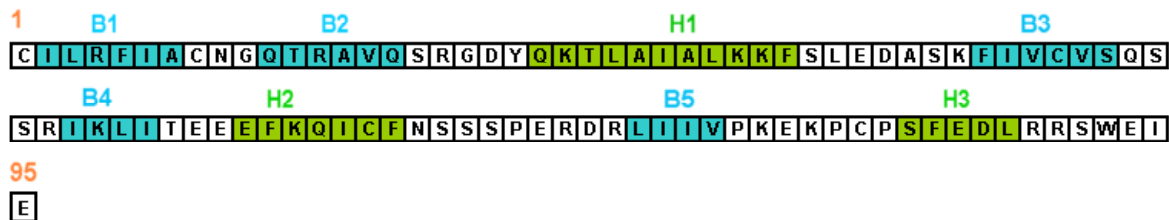


Abbildung 50: Durch die Aufklärung der NMR-Struktur von Byr2 konnte die Reihenfolge der Sekundärstrukturelemente in der Aminosäuresequenz festgelegt werden. Die fünf  $\beta$ -Faltblätter und die drei  $\alpha$ -Helices sind in der Topologie nach  $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$  angeordnet.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Struktur von Byr2-RBD zu verbessern. Dabei sollte eine verfeinerte Byr2-Struktur zum einen zu einer einheitlicheren Strukturvorstellung konvergieren und zum anderen die Sekundärstrukturelemente im Modell (Bändermodell etc.) deutlicher ausgeprägt sein. Um dies zu erreichen, muss eine größere Zahl verfügbarer Distanzbeschränkungen in die Strukturrechnung einbezogen werden. Eine anschließende Gegenüberstellung der entsprechenden Qualitätskriterien für eine NMR-Struktur gibt Auskunft über die Güte der verbesserten Byr2-Struktur.

## 5.2. Ergebnis der Strukturverfeinerung von Byr2-RBD

Ein großer Vorteil in der Strukturaufklärung von Makromolekülen durch die NMR-Spektroskopie liegt in der Möglichkeit, das zu untersuchende Protein in seiner physiologischen Lösung zu untersuchen. Das Ergebnis einer strukturellen Untersuchung mit dieser Methode kann deshalb nur einen Moment des sich in seiner molekularen Dynamik befindlichen Moleküls abbilden. Wie aber soll man die vielen in der Strukturrechnung erhaltenen "Momentaufnahmen" des Moleküls nach ihrer Qualität beurteilen?

Ein wichtiges Gütekriterium wird schon bei der Auswahl von wenigen Strukturen aus dem Pool der gerechneten Strukturen angelegt: die Energiewerte für eine gerechnete Struktur. Lässt sich während der Strukturrechnung eine für die Strukturrechnung vorgegebene Distanzbeschränkung nicht erfüllen, wird diese gegen eine der in Tabelle 25 aufgeführten Energie-Kategorien verstoßen.

Die Distanzvorgabe kann nicht erfüllt werden und wird im Maße ihrer Abweichung von der Vorgabe mit einer entsprechenden Verletzungsenergie "markiert". Die Summe aller in der

Struktur erfassten Kategorien von möglichen Verletzungsenergien bilden die Gesamtenergie einer gerechneten Struktur, nach deren Wert sich die Auswahl der zehn besten aller gerechneten Strukturen zu einem Ensemble richtet. Die Sortierung aller gerechneten Strukturvorstellungen nach ihren Gesamtenergiewerten zu einem Ensemble von Strukturen bilden somit die Grundlage für weitere Qualitätsanalysen.

Vergleich der NOE-Kontakte und der Energien von Byr2 vor und nach der Strukturverfeinerung					
	Anzahl der NOEs		Energien (kJ mol <sup>-1</sup> )		
	vorher	nachher		vorher	nachher
<b>Total</b>	<b>824</b>	<b>2021</b>	<b>E<sub>total</sub></b>	<b>6644 ± 1162</b>	<b>4217 ± 66</b>
			<b>E<sub>bond</sub></b>	<b>255 ± 39</b>	<b>219 ± 17</b>
			<b>E<sub>angle</sub></b>	<b>1991 ± 392</b>	<b>1148 ± 77</b>
<b>Intraresiduelle NOEs</b>	<b>316</b>	<b>827</b>	<b>E<sub>vdW</sub></b>	<b>1489 ± 206</b>	<b>1730 ± 132</b>
<b>Sequentielle (i, i + 1) NOEs</b>	<b>217</b>	<b>524</b>	<b>E<sub>NOE</sub></b>	<b>661 ± 36</b>	<b>754 ± 76</b>
<b>Medium-range (i, i+j; 1 &lt; j ≤ 4) NOEs</b>	<b>94</b>	<b>243</b>	<b>E<sub>CDIH</sub></b>	<b>1309 ± 362</b>	<b>72 ± 12</b>
<b>Long-range (i, i + j; 4 &lt; j) NOEs</b>	<b>197</b>	<b>427</b>	<b>E<sub>IMP</sub></b>	<b>912 ± 341</b>	<b>284 ± 38</b>
			<b>E<sub>andere</sub></b>	<b>25 ± 16</b>	<b>8,79</b>

*Tabelle 25: Strukturparameter von Byr2-RBD. In der Tabelle wird eine detaillierte Zusammenfassung der Anzahl der Distanzbeschränkungen für die Strukturrechnung vor und nach der Strukturverfeinerung dargestellt. Ebenso sind die Werte der entsprechenden Energiearten gegenübergestellt. Die aufgelisteten Energien ergeben sich aus den Mittelwerten der zehn energetisch besten Strukturen mit der jeweiligen Standardabweichung aus einem Pool von insgesamt 1000 berechneten Strukturen.*

Den Werten der Tabelle 25 lässt sich entnehmen, dass sich die Energien im Rahmen der Strukturverfeinerung deutlich reduziert haben. Dies ist nicht zwangsläufig selbstverständlich, da für Byr2 aus den Spektren weit über 1000 neue NOE-Abstandsbeschränkungen für die Strukturrechnung gefunden werden konnten. Eine Vielzahl an Abstandsbeschränkungen für die Strukturrechnung bietet auch eine höheres Maß an Möglichkeiten, dass diese in der Moleküldynamikrechnung nicht erfüllt werden können und somit mit Verletzungsenergien belegt werden müssen.

Die Abbildung 51 zeigt eine detaillierte Übersicht über die Anzahl und Art der NOE-Einschränkung für jede Aminosäure vor der Strukturverfeinerung.

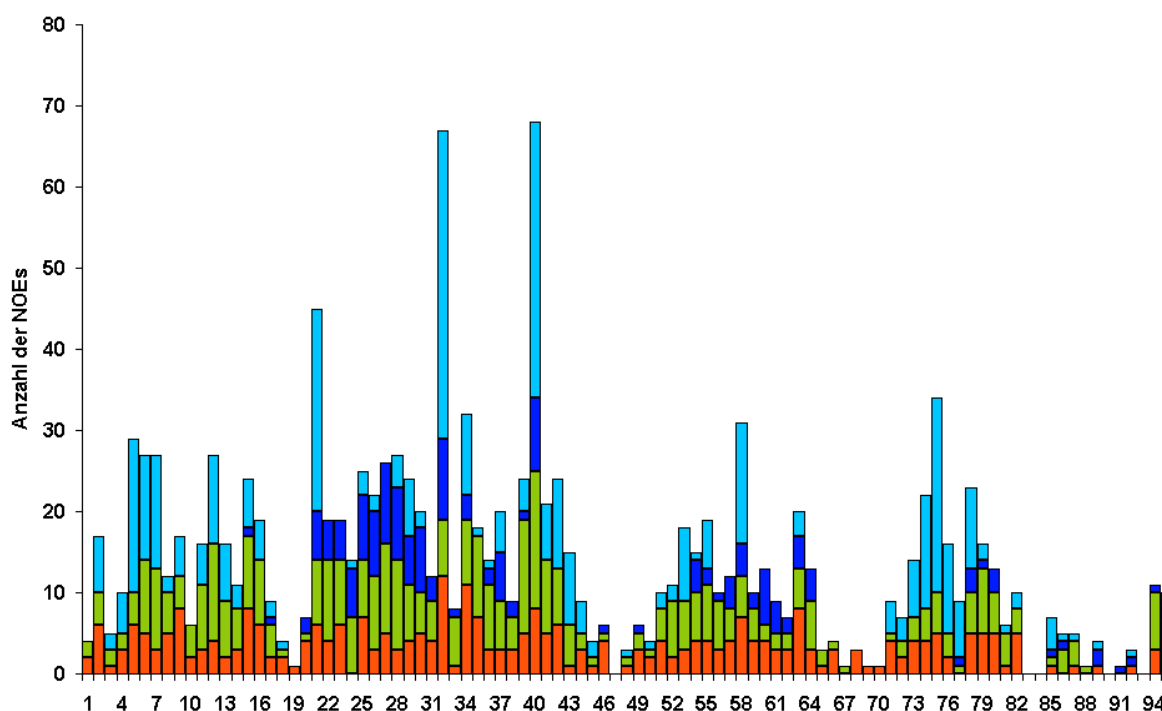


Abbildung 51: Übersicht über die Anzahl der NOEs für jede Aminosäure vor der Strukturverfeinerung. Für die flexiblen Bereiche am C-Terminus konnten nur wenige NOEs gefunden werden. (Rot: intraresiduelle NOEs ( $i=j$ ), grün: sequentiell benachbarte NOEs ( $|i-j|=1$ ), dunkelblau: kurzreichweitige NOEs ( $1 < |i-j| \leq 4$ ), hellblau: langreichweitige NOEs ( $|i-j| > 4$ )).

Im Rahmen dieser Dissertation konnten nach weiterer Auswertung der NOESY-Spektren insgesamt 1197 zusätzliche NOE-Kontakte für die Strukturrechnung gefunden werden. Die meisten Distanzbeschränkungen stammen aus einem 2D-NOESY-Spektrum, gemessen in  $\text{H}_2\text{O}$ . Vergleicht man die Abbildungen Abbildung 5151 und 52, so erkennt man, dass besonders für die Bereiche der Sekundärstrukturelemente viele NOEs gefunden werden konnten. Dies spiegelt sich auch deutlich in den entsprechenden RMSD-Werten wider, welche sich in Folge der Strukturverfeinerung verbessert haben. Der RMSD-Wert ist ein Maß für die Konvergenz von bestimmten Strukturen und bezieht sich hier auf ein Strukturbündel mit den zehn energetisch besten Strukturen. Da der C-Terminus der Byr2-Domäne keine geordnete Faltung annimmt, wurden bei der Berechnung des RMSD-Wertes lediglich die Residuen 1-82 des Moleküls berücksichtigt.

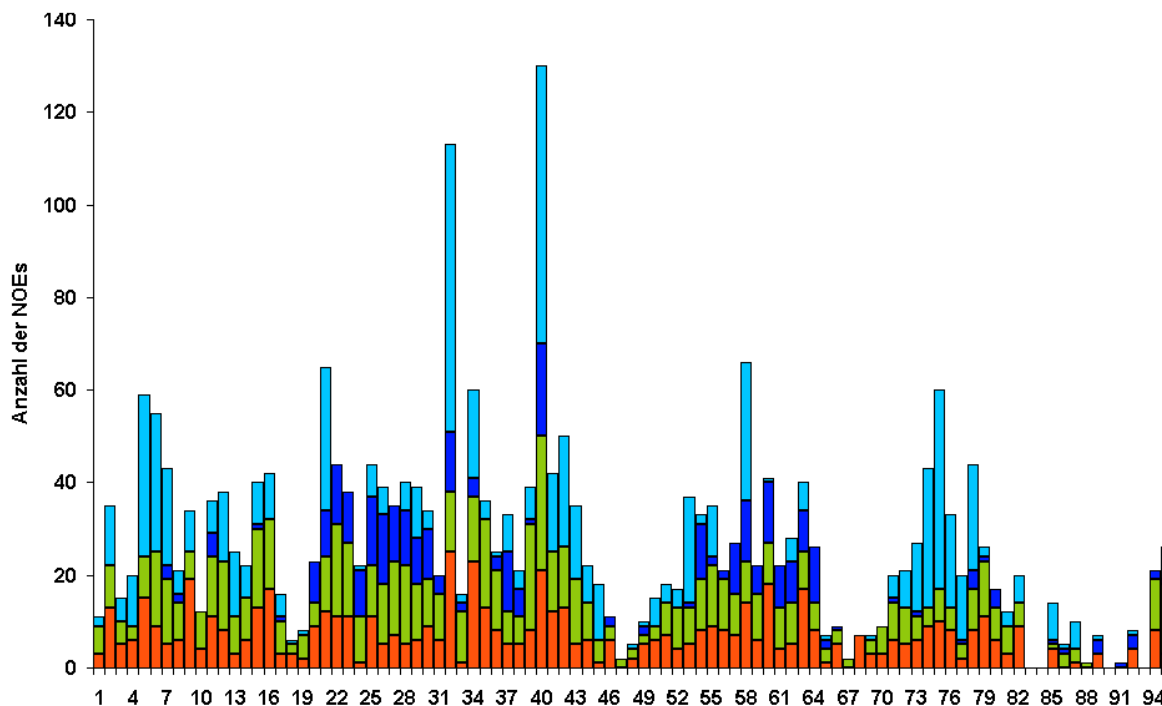
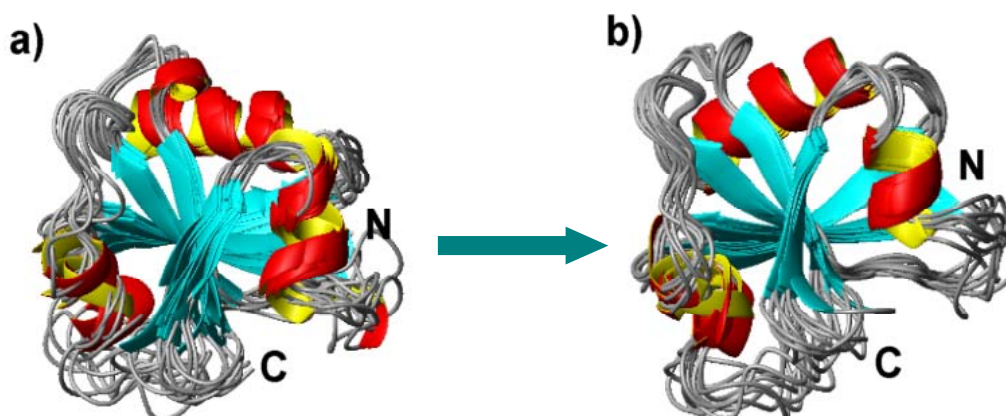


Abbildung 52: Übersicht über die Anzahl der NOEs für jede Aminosäure nach der Strukturverfeinerung. Es konnten 1197 zusätzliche Distanzbeschränkungen gefunden werden, welche die Struktur definieren. (Rot: intraresiduelle NOEs ( $i=j$ ), grün: sequentiell benachbarte NOEs ( $|i-j|=1$ ), dunkelblau: kurzreichweitige NOEs ( $1<|i-j|\leq 4$ ), hellblau: langreichweitige NOEs ( $|i-j|>4$ ).

Das Ensemble der besten aus jeweils 1000 gerechneten Strukturen wurde an den Rückgrat-Atomen N, C $^\alpha$  und C, an allen schweren Atomen (N, C, O, S) im Bereich der Aminosäuren Cys1 bis Cys82 bzw. nur an den Sekundärstrukturelementen, mit dem Programm MOLMOL [Kor96] überlagert und der RMSD-Wert zur gemittelten Struktur berechnet. Tabelle 26 vergleicht die zugehörigen RMSD-Werte vor und nach der Strukturverfeinerung.

Bereiche in der AS-Sequenz	Byr2 vor der Strukturverfeinerung (in Å)	Byr2 nach der Strukturverfeinerung (in Å)
Rückgrat N, C $^\alpha$ , C (1-82)	1,143	0,81
schwere Atome N,C,O,S (1-82)	1,207	0,879
Rückgrat (nur Sekundärstrukturelemente)	0,838	0,514
schwere Atome (nur Sekundärstrukturelemente)	0,881	0,553

Tabelle 26: Gegenüberstellung der RMSD-Werte (in Å) der Byr2-Struktur vor und nach der Strukturverfeinerung. Für die Sekundärstrukturelemente wurden die bereits weiter oben erwähnten Aminosäurenresiduen für die RMSD-Wert-Berechnung selektiert.



*Abbildung 53: Überlagerung der zehn energetisch besten Strukturen. Beide Strukturbündel wurden in den Aminosäurenbereichen 1-82 überlagert. a) Strukturbündel vor der Strukturverfeinerung. b) Die übereinanderlagerten Strukturen, nachdem die 1197 zusätzlich gefundenen NOEs in der Strukturrechnung berücksichtigt wurden .*

Die bisher analysierten Werte für die zu Rate gezogenen Qualitätsbeurteilungskriterien für NMR-Strukturen weisen durchgängig auf eine Verbesserung der Byr2-Struktur hin. Eine präzisere Definition sowohl der Loopregionen als auch der Bereiche der Sekundärstrukturelemente der Byr-Struktur lässt sich auch visuell anhand der Abbildung 53 entnehmen.

Betrachtet man die große Zahl von insgesamt 2021 NOE-Abständen, die in die Strukturrechnung einfließen, muss man sich die Frage stellen, inwieweit sich diese Menge an NOE-Kontakten tatsächlich mit dem experimentellen Spektrum in Einklang bringen lassen. Durch die R-Wert-Analyse (RFAC, [Gro00]) lässt sich zu diesem Zweck ein benanntes experimentelles NMR-Spektrum mit einem zurückgerechneten Spektrum vergleichen. Dabei bezieht sich das zurückgerechnete Spektrum auf eine mit diesen Abstandsbeschränkungen gerechnete Strukturvorstellung.

Distanzklasse des R-Faktors	ursprüngliche Byr2-Struktur	verfeinerte Byr2-Struktur
alle Signale	0,475	0,443
intraresiduelle Signale	0,2	0,193
sequentielle Signale	0,183	0,194
mittelreichweitige Signale	0,174	0,207
langreichweitige Signale	0,224	0,228
interresiduelle Signale	0,2	0,209

*Tabelle 27: R-Werte für die verschiedenen Distanzklassen der verfeinerten Struktur von Byr2-RBD im Vergleich mit der Ausgangsstruktur.*

Die aus der R-Wert-Analyse ermittelten R-Werte geben Auskunft darüber, inwieweit die jeweilige für die Rückrechnung eingesetzte Struktur mit den tatsächlichen experimentiellen Daten übereinstimmt. So zeigt dieser Qualitätswert, inwiefern die für die Strukturrechnung verwendeten Distanzbeschränkungen das experimentelle Spektrum erfüllen.

Berücksichtigt man die Gesamtheit aller Signale im entsprechenden R-Wert, so stellt man anhand der errechneten Werte fest, dass sich im Rahmen der Strukturverfeinerung der R-Wert geringfügig zum Positiven verändert hat.

Eine abschließende Analyse der verfeinerten Byr2-Struktur liefert eine Strukturrechnung mit dem Moleküldynamik-Programm XPLOR. Bezieht man Wasser als natürliches Lösungsmittel in die Strukturrechnung mit ein, können NOE-Kontakte mit dem Lösungsmittel in Wechselwirkung treten und so eine Vorstellung der Struktur in ihrem physiologischen Umfeld wiedergeben.

Analysierte Strukturen		Verbesserte Strukturen	
Art der Verletzung	Energie[kj/mol]	Art der Verletzung	Energie[kj/mol]
E <sub>NOE</sub>	139,63 ± 32,2	E <sub>NOE</sub>	52,48 ± 10,57
E <sub>dihedrale Winkel</sub>	8,63 ± 1,47	E <sub>dihedrale Winkel</sub>	2,91 ± 0,63
E <sub>Gesamt</sub>	3966,84 ± 562	E <sub>Gesamt</sub>	-3043,4 ± 119,9
RMSD / mittlere Struktur nm		RMSD / mittlere Struktur nm	
Rückgrat	1,44 ± 0,24	Rückgrat	1,53 ± 0,22
alle schweren Atome	2,5 ± 0,31	alle schweren Atome	2,57 ± 0,25
Ramachandran / Region	Anzahl	Ramachandran / Region	Anzahl
meist favorisiert	54,70 ± 3,40	meist favorisiert	66,79 ± 2,20
erlaubt	26,09 ± 4,81	erlaubt	20,68 ± 2,86
generell erlaubt	12,52 ± 3,64	generell erlaubt	7,91 ± 2,58
nicht erlaubt	6,63 ± 2,02	nicht erlaubt	4,57 ± 2,36
WHATCHECK (structure Z-scores)		WHATCHECK (structure Z-scores)	
Ramachandran plot appearance	-7,17 ± 0,28	Ramachandran plot appearance	-4,92 ± 0,48
2 <sup>nd</sup> generation packing quality	-3,41 ± 0,31	2 <sup>nd</sup> generation packing quality	-2,80 ± 0,16
χ <sup>1</sup> .χ <sup>2</sup> rotamer normality	-6,53 ± 0,27	χ <sup>1</sup> .χ <sup>2</sup> rotamer normality	-4,09 ± 0,36
Backbone conformation	-16,47 ± 1,92	Backbone conformation	-13,48 ± 2,28
Overall quality (packing score)	-72,77 ± 6,91	Overall quality (packing score)	-58,29 ± 8,60

*Tabelle 28: Parameter zur Beurteilung der Qualität der Byr2-Struktur vor und nach der Verfeinerung unter Berücksichtigung von Wasser als Lösungsmittel. Durch das Einbeziehen der Interaktionen mit dem Lösungsmittel in die Strukturverfeinerung werden die Energien als Maß der Verletzung der Einschränkungen wie erwartet geringer. Die Verteilung der Diederwinkel nach Ramachandran hat sich durch die Strukturverbesserung ebenfalls deutlich zum Positiven verändert. Es werden jeweils die Mittelwerte der zehn Eingangs- bzw. verfeinerten Strukturen und die zugehörige Standardabweichung angegeben.*

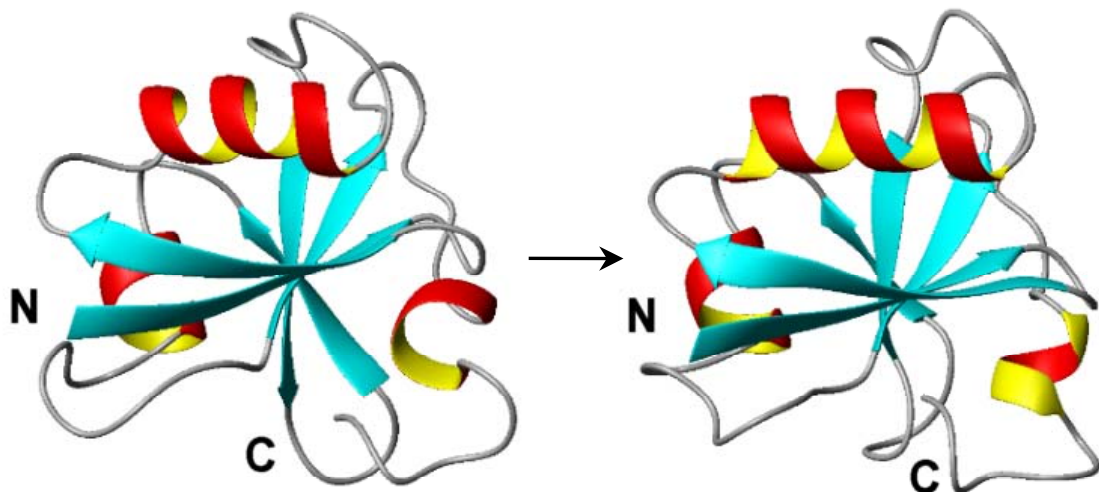
Die Datenbasis der Strukturverbesserung von Byr2-RBD in Wasser bilden die zehn energetisch besten Strukturen aus der Strukturrechnung mit CNS und die experimentell ermittelten Einschränkungen des Konformationsraumes. Unter Berücksichtigung der Einschränkungen wurden die zehn besten Strukturen bei entsprechender Gewichtung der Kraft-



felder mit dem Programm XPLOR-NIH verfeinert. Man erhält neben den zehn verfeinerten Strukturen zusätzlich die Analyse der in die Rechnung eingebrachten und der verfeinerten Strukturen. Diese Analysen ermöglichen eine Quantifizierung der Strukturverbesserung, da aufgrund der unterschiedlichen Kraftfeld-Gewichtungen bei herkömmlicher Strukturrechnung und Verfeinerung ein direkter Vergleich der Energien schwierig ist.

<b>Analysierte Struktur</b>	→	<b>Verbesserte Struktur</b>
-----------------------------	---	-----------------------------

A)



B)

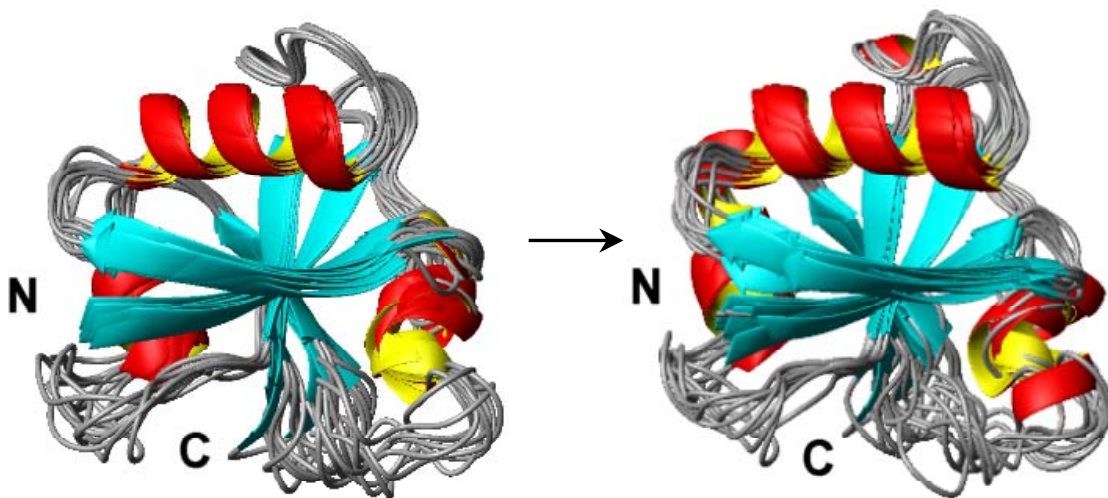


Abbildung 54: Graphische Darstellung der verfeinerten Struktur nach dem Verfahren von Linge und Spronk. A) Tertiärstruktur von Byr2-RBD vor (links) und nach (rechts) der Verbesserung der Struktur im Lösungsmittel. B) Überlagerung der jeweils zehn Eingangsstrukturen (links) und der verfeinerten Strukturen (rechts). Überlagert wurden die Aminosäuren des Proteinrückgrats der Residuen 1-82. Der RMSD-Wert vor und nach der Strukturverbesserung in Wasser beträgt 0,0758 nm, bzw. 0,0808 nm.

In Abbildung 54 sind die Ergebnisse der Strukturverbesserung von Byr2-RBD graphisch dargestellt. Die Strukturverbesserung, die nach der Methode von Linge und Spronk [Lin03] erfolgte, führte zu einer deutlichen Verringerung der Gesamt-Energie des Moleküls und einer Verschiebung der Diederwinkel  $\varphi$  und  $\Psi$  in den bevorzugten Bereich (Tabelle 28).

Sind die Diederwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  erfüllt, findet man sie in der Darstellung eines Ramachandran-Plots in den bevorzugten, erfüllten und erwarteten Kombinationsbereichen. Von eingangs 54,70 Winkel-Kombinationen liegen nach der Verbesserung 66,79 Kombinationen im bevorzugten Bereich. Der relativ hohe RMSD-Wert ergibt sich aufgrund des automatisierten Analyse-Verfahrens mit PROCHECK, bei dem das gesamte Molekül einschließlich der frei beweglichen Termini analysiert wird. Es zeigte sich, dass bei diesem Verfahren zur Strukturverbesserung der RMSD-Wert als Maßstab schwierig zu beurteilen und zu vergleichen ist. Die Energien und Winkelverteilungen im Ramachandran-Plot stellen bessere quantitative Kriterien zur Beurteilung einer verfeinerten Struktur dar.

Vergleicht man die RMSD-Werte vor und nach der Verfeinerung der Byr2-RBD, stellt man eine geringere Konvergenz der verfeinerten Strukturen ersichtlich an einem höheren RMSD-Wert der verbesserten Strukturen fest. Dies ist eine Folge des bei der Strukturrechnung angewandten Verfahrens, bei dem stärker gewichtete "nicht-bindende" Parameter zur Geltung kommen.

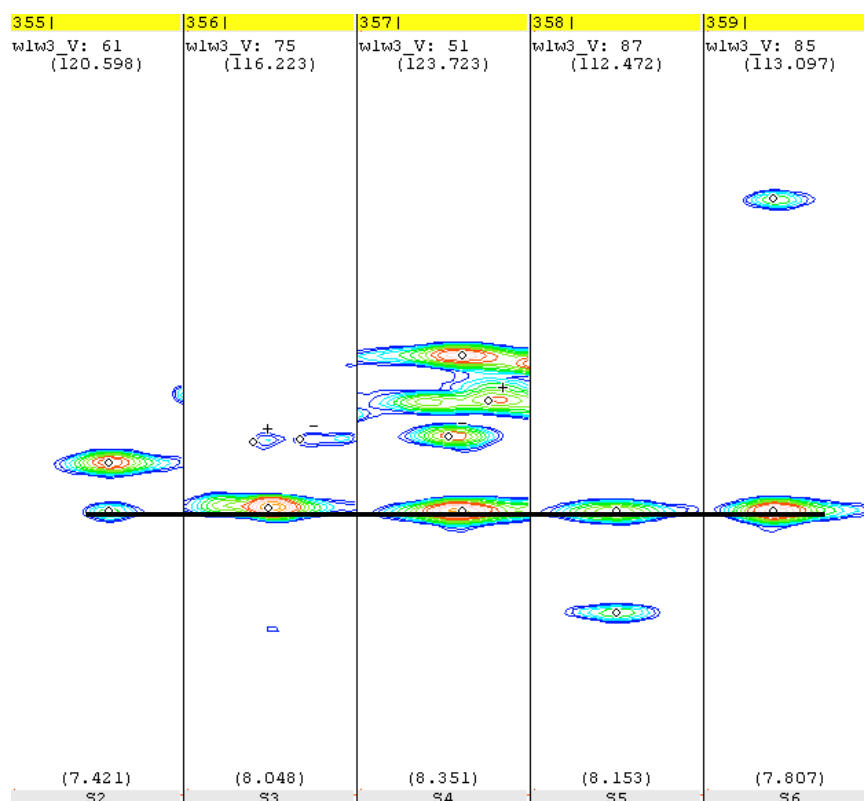
## 6. Strukturelle Untersuchungen an Nore1-RBD

Nore1-RBD ist mit seinen 160 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 18,6 kD der bislang größte bekannte Vertreter unter den Ras-Bindedomänen. Alle strukturell bekannten RBDs haben trotz zum Teil erheblicher sequentieller Unterschiede das gleiche Faltungsmuster: den ubiquitin fold. Nun interessiert die Frage, ob die dreidimensionale Struktur von Nore1-RBD in atomarer Auflösung in Bezug auf ihre Faltung und die Anzahl und Reihenfolge der Sekundärstrukturelemente den anderen in ihrer Struktur bekannten RBDs ähnelt. Zum anderen ließen sich durch weitere Experimente bei einer bekannten Struktur der RBD Hinweise darauf ableiten, wie die Wechselwirkung mit Ras auf atomarer Ebene stabilisiert wird.

In dieser Arbeit sollten die Grundlagen zur Strukturaufklärung der RBD von Nore1 gelegt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse vorgestellt, die aus den in der vorliegenden Arbeit gemessenen NMR-Spektren einer detaillierten Auswertung mit der Software AUREMOL [AUR04] zugänglich waren.

### 6.1. Arbeiten zur sequentiellen Zuordnung von Nore1-RBD

Die sequentielle Zuordnung ist der aufwendigste Schritt bei der Bestimmung von NMR-Strukturen. Ziel der sequentiellen Zuordnung der Hauptkettenatome ist es, jedes Signal im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum (s. Abbildung 57) einem Aminosäurerest des Proteins zuzuordnen. Man erkennt im Bereich zwischen 7,7-8,7 ppm  $^1\text{H}$ -Verschiebung sowie zwischen 117-126,5 ppm  $^{15}\text{N}$  - Verschiebung viele kaum voneinander separierte Signale. Um die Auflösung zu verbessern, wurden in dieser Arbeit dreidimensionale heteronukleare NMR-Experimente herangezogen. Durch die Kombination der Informationen aus den Experimenten HNCA, CBCANH, HN(CO)CA und CBCA(CO)NH konnten so bisher 40 Aminosäuren der 160 Aminosäuren großen Proteindomäne zugeordnet werden. Dabei versucht man, möglichst zusammenhängende "Ketten" benachbarter Spinsysteme zu bilden und diese anhand von charakteristischen chemischen Verschiebungen von  $\text{C}\alpha$  und  $\text{C}\beta$ -Kernen in die Aminosäuresequenz von Nore1-RBD einzupassen. Im Idealfall gelingt es, sequentiell benachbarte Spinsysteme anhand eines HNCA-Spektrums zuzuordnen. Dies hängt zum einen von der Größe des untersuchten Proteins und seiner Konzentration in der Probenlösung ab und zum anderen von der erreichten Auflösung in den entsprechenden NMR-Experimenten.

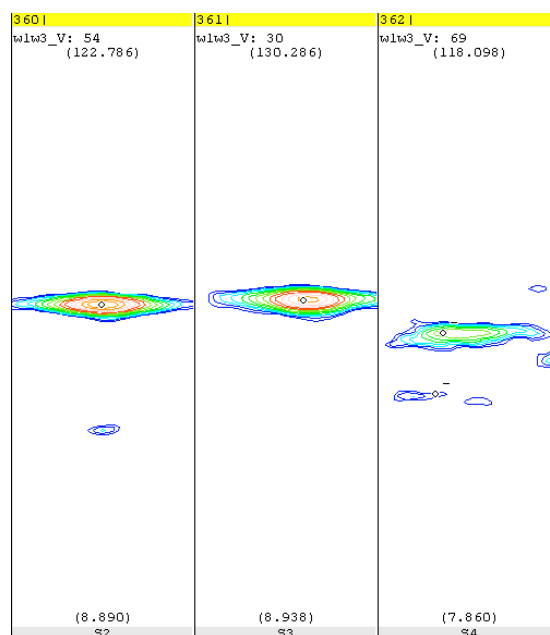


*Abbildung 55: Gezeigt sind Streifen einzelner Spinsysteme aus dem HNCA-Spektrum: Für das  $C\alpha(i)$  und  $C\alpha(i-1)$  in Streifen S2 gibt es vier Spinsysteme (S3, S4, S5 und S6), die im HNCA-Spektrum als sequentieller Vorgänger in Frage kommen könnten (schwarze Linie).*

Mit einem Molekulargewicht von über 18 kDa kommt Nore1-RBD bereits in einen Bereich, der in den durchgeführten Tripelresonanzexperimenten zu beträchtlichen Signalüberlappungen führt. Das HNCA-Spektrum konnte aufgrund der Vielzahl von Zuordnungsmöglichkeiten für ein Spinsystem nur in seltenen Fällen eine eindeutige Zuordnung zweier oder mehrerer benachbarter Spinsysteme liefern. Insgesamt konnten im HNCA-Spektrum 103 Spinsysteme identifiziert werden, die zwei bis fünf Zuordnungsmöglichkeiten von Spinsystemen eines sequentiellen Vorgängers hatten. Gibt es für ein Spinsystem mehr als eine Zuordnungsmöglichkeit im HNCA-Spektrum, lassen sich die Spinsysteme nicht mehr eindeutig zuordnen (s. hierzu Abbildung 55). Zunächst versuchte man durch das Hinzuziehen der Informationen aus einem gemessenen CBCA(CO)NH- und einem CBCANH-Spektrum über die so erhaltenen  $C\alpha$ - und  $C\beta$ -Frequenzen ein weiteres Ausschlusskriterium zu schaffen. Im Idealfall gelang es somit durch die Kombination der Informationen aus dem CBCA(CO)NH- und dem CBCANH-Spektrum für eine Aminosäure in der Sequenz die Resonanzfrequenzen des eigenen  $C\alpha$  und  $C\beta$  sowie die Frequenzen des  $C\alpha$  und  $C\beta$  des sequentiellen Vorgängers herauszufiltern. Dies war allerdings nur für 32 Aminosäuren der

Nore1-RBD möglich. Für die restlichen Aminosäuren konnte entweder aufgrund des geringen Signal zu Rausch-Verhältnisses kein eigenes  $C\beta$  im CBCANH-Spektrum gefunden werden, oder es ließen sich wegen der hohen Dichte von sich überlappenden Spinsystemen keine  $C\alpha$ - und  $C\beta$ - Signale des sequentiellen Vorgängers zuordnen.

Ein anderes Problem, das im Zusammenhang mit der Auswertung des HNCA – Spektrums auftrat, war die Überlagerung des schwächeren  $C\alpha$ -Signals der vorhergehenden Aminosäure durch das stärkere  $C\alpha$ -Signal der eigenen Aminosäure im Spinsystem.



*Abbildung 56: Beispiele für Spinsysteme im HNCA-Spektrum, in denen das  $C\alpha$ - Signal der in der Sequenz vorhergehenden Aminosäuren vom  $C\alpha$ - Signal der eigenen Aminosäure überlagert wird.*

In Abbildung 56 sind drei verschiedene Spinsysteme aus dem HNCA-Spektrum gezeigt, in denen lediglich jeweils nur ein deutliches Signal vom  $C\alpha$  der eigenen Aminosäure sichtbar ist. Die Signale des eigenen  $C\alpha$  erscheinen in den gezeigten Spinsystemen nicht nur außerordentlich groß, sondern auch etwas verzerrt im Spektrum. Ein Signal vom  $C\alpha$  des sequentiellen Vorgängers konnte nicht sicher gefunden werden. Da auch die Analyse der CBCANH- oder CBCA(CO)NH-Spektren in diesen Fällen keine Auskunft über die Resonanz des sequentiell benachbarten  $C\alpha$  geben konnte, wurde diese Informationslücke durch ein HN(CO)CA-Spektrum geschlossen. Bei diesem Tripelresonanzexperiment erhält man zu jedem Hauptkettenamid die  $^{13}C\alpha$ -Resonanz der davorliegenden Aminosäure.

Abbildung 57 soll einen Überblick über den bisherigen Stand der Zuordnungsarbeit der Ras-Bindedomäne von Nore1 geben. Es handelt sich hier um ein  $^1H$ - $^{15}N$ -TROSY-HSQC-Spektrum, in dem alle Signale der Resonanzfrequenzen von N- und  $H^N$ -Atomen aller Aminosäuren von Nore1-RBD dargestellt sind. Die 40 bisher nach ihrer sequentiellen Lage zugeordneten Aminosäuren der RBD sind mit Aminosäuretyp und Aminosäurenummer in der

Sequenz des Proteins gekennzeichnet. Insgesamt zeigt das Spektrum 175 teilweise sehr schlecht separierte Signale, von denen 124 durch Amidprotonen von Nore1-RBD erzeugt werden. Die restlichen 51 Signale sind vermutlich auf Signale aus den Seitenketten oder auf Störungen zurückzuführen.

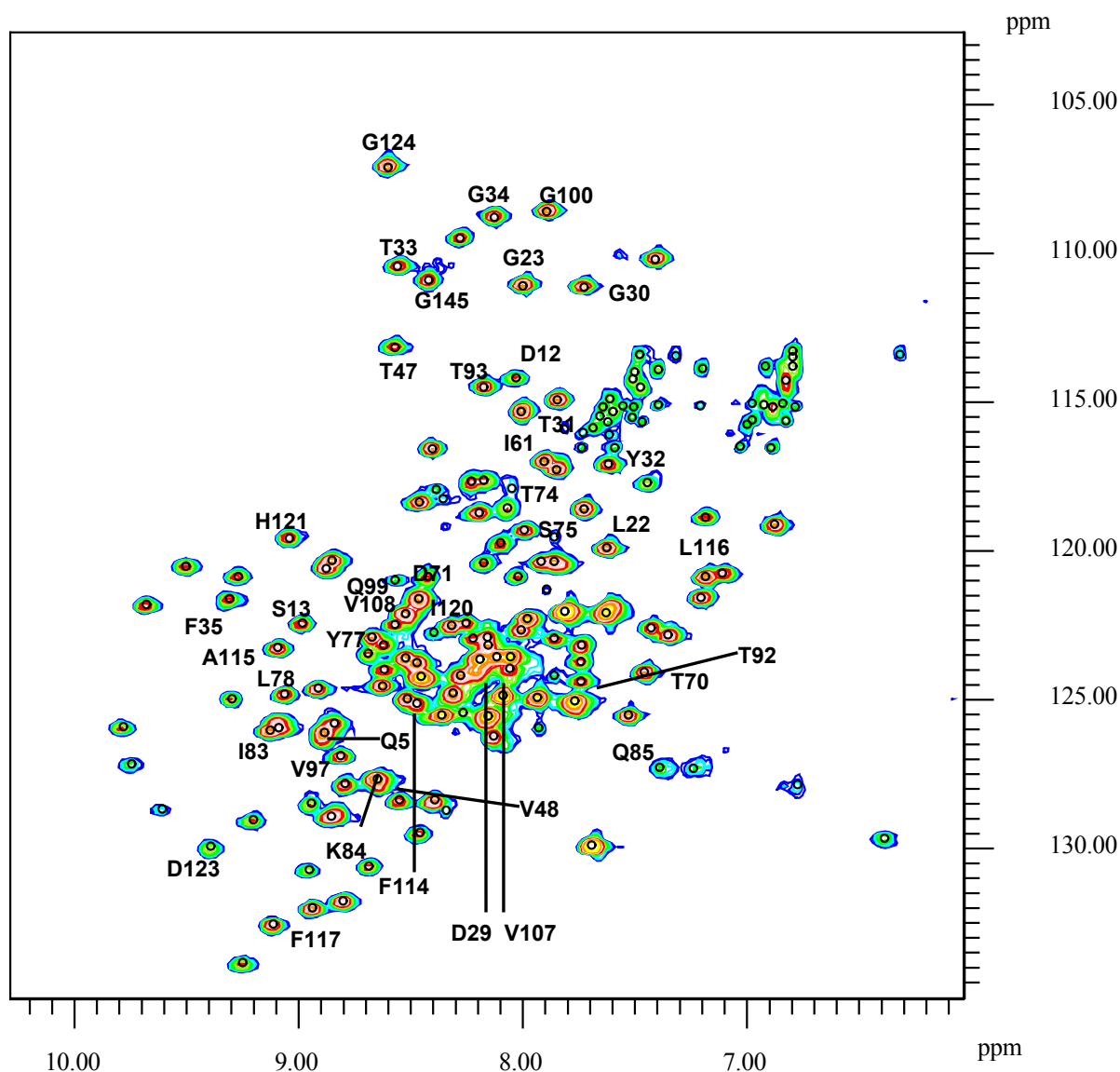
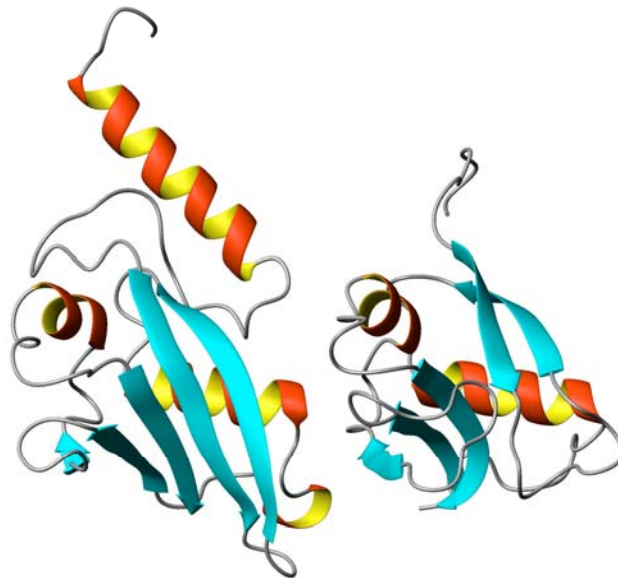


Abbildung 57: Ein  $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum gemessen bei 298 K bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz, pH 6,9 mit einer  $^{15}\text{N}$ -markierten Probe von Nore1-RBD. Die zugeordneten Aminosäuren aus der Sequenz des Proteins sind im Ein-Buchstaben-Code beschriftet.

## 7. Diskussion

### 7.1. Struktur von AF6-RBD

Grundlage für die Aufklärung der dreidimensionalen NMR-Struktur bildete die sequentielle Zuordnung von 93 % des Proteinrückgrats, welche somit im Bereich der Vollständigkeit für die Zuordnung ähnlich großer Proteine liegt. Die gelöste Struktur von AF6-RBD ist durch insgesamt 1737 Abstandsbeschränkungen für die Strukturrechnung definiert. Nachdem erst kürzlich von einer japanischen Arbeitsgruppe [Zhao05] die NMR-Struktur der zweiten Ras-Bindedomäne von AF6 (im Folgenden wird diese zweite AF6-RBD als AF6-RA bezeichnet) in der Proteindatenbank [RCBS] unter dem Code 1WXA veröffentlicht wurde, sollen die Unterschiede dieser beiden Ras-Bindedomänen des Proteins AF6 herausgestellt werden. Die Domäne AF6-RA hat eine Länge von 116 Aminosäuren und ist der Struktur von AF6-RBD in ihrer Faltung sehr ähnlich. Das fünfsträngige gemischte antiparallele  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta_1$ : Thr11-Ile14,  $\beta_2$ : Lys26-Leu29,  $\beta_3$ : Tyr57-Met63,  $\beta_4$ : Lys77-Ile79 und  $\beta_5$ : Leu101-Arg107) faltet sich zusammen mit den beiden  $\alpha$ -Helices ( $\alpha_1$ : Ala36-Tyr47,  $\alpha_2$ : Pro87-Arg92) in den für die Ras-Bindedomänen typischen Ubiquitinfold.



*Abbildung 58: Die beiden Ras-Bindedomänen des AF6-Proteins sind hier räumlich gleich orientiert. Links im Bild befindet sich die größere AF6-RBD, rechts die AF6-RA, welcher die n-terminale Helix fehlt.*

Legt man die Daten aus der Veröffentlichung von Rudolph et al. [Rud01] zugrunde, ergibt sich für die N-terminale Ras-Bindedomäne von AF6 eine Dissoziationskonstante  $K_D$  für den AF6-RBD•H-Ras-Komplex von 2,2  $\mu\text{M}$ . Als um eine Größenordnung schwächer mit einer  $K_D$



von 35  $\mu\text{M}$  wurde die Stabilität des Komplexes zwischen der AF6-RA und H-Ras charakterisiert. Mit der Kenntnis der sequentiellen Unterschiede beider Ras-Bindedomänen ließ sich ein sequentielles Alignment beider Ras-Bindedomänen mit dem Programm Auremol [AUR04] erstellen, welches in dieser Arbeit anschließend noch verfeinert wurde (s. Abbildung 59). Dieses sequentielle Alignment soll als Grundlage zur Klärung der Frage dienen, welche strukturellen Unterschiede beider RBDs die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten im Komplex mit H-Ras bewirken. In der obersten und untersten Reihe des sequentiellen Alignments sind die Nummern der Aminosäureresiduen in der Sequenz der entsprechenden Ras-Bindedomäne aufgelistet. Bei AF6-RBD darunter und bei AF6-RA darüber ist im Einbuchstabencode die zugehörige Aminosäure aufgeführt. Die ersten 30 Aminosäuren von AF6-RBD wurden im Alignment nicht berücksichtigt. Dies entspricht der Helix A1 und einem Teil der darauffolgenden Loopregion in der Struktur der Domäne. Da diese Regionen in der RA von AF6 fehlen, sollte durch das Weglassen dieser Aminosäuren in AF6-RBD ein möglichst sauberes Alignment derjenigen Sekundärstrukturelemente erfolgen, die in den verglichenen Sequenzen ihrer Anzahl nach gleich sind. Ebenfalls wurde der C-terminale Teil der AF6-RA mit dem fünften  $\beta$ -Faltblatt nicht berücksichtigt, da dieser Region in der RBD von AF6 keine Bedeutung bei der Komplexbildung mit H-Ras zugesprochen wird. Die ersten beiden  $\beta$ -Faltblätter (blaue Markierung) und die beiden  $\alpha$ -Helices (gelbgrüne Markierung) ließen sich dabei sehr gut angleichen.

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
AF6-RBD	S	Q	P	T	E	D	L	E	F	H	G	V	M	R	F	Y	F	Q	D			K	A	A	G	N	F	A	T	K	C	I	R	V	S	S	T	A
AF6-RA	G	S	S	G	S	S	G	S	G	G	T	L	R	I	Y	A		D	S	L	K	P			N	I	P	Y	K	T	I	L	L	S	T	T	D	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		17	18	19	20	21			22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	

	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82									83	84		85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
AF6-RBD	Q	D	V	I	E	T	L	A	E	K	F	R	P	D								M	R		M	L	S	S	P	K	Y	S	L	Y	E	V	
AF6-RA	D	F	A	V	A	E	S	L	E	K	Y	G	L	E	K	E	N	P	K	D	Y	C	I	A	R	V	M	L	P	P	G	A	Q	H	S	D	E
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73

	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
AF6-RBD	S	G	E	R	R	L	D	I	D	E	K	P	L	V	V	Q	L	N	W	N	K	D
AF6-RA	A	K	E	I	I	L	D	D	D	E	C	P	L	Q	I	F	R	E	W	P	S	D
	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97

Abbildung 59: Sequentielles Alignment der beiden Ras-Bindedomänen von AF6.  $\alpha$ -helikale Bereiche in den Sequenzen sind gelbgrün,  $\beta$ -Faltblattregionen blau gefärbt. Hochkonservierte Regionen in der AS-Sequenz beider RBDs sind orangerot, komplementäre Bereiche grün und geringfügig komplementäre Bereiche türkis gefärbt.

Anschließend wurde das Alignment nach konservierten Aminosäuren durchsucht. Hochkonservierte Aminosäuren wurden in der Abbildung 59 orangerot, komplementäre grün und geringfügig komplementäre Aminosäuren türkis gefärbt. Im Anschluß an das sequentielle Alignment wurde auf dessen Grundlage ein strukturelles Alignment beider RBD's im Komplex mit H-Ras erstellt. Dies erfolgte durch das Übereinanderlagern der AF6-RA an das AF6-RBD im Komplex mit H-Ras.

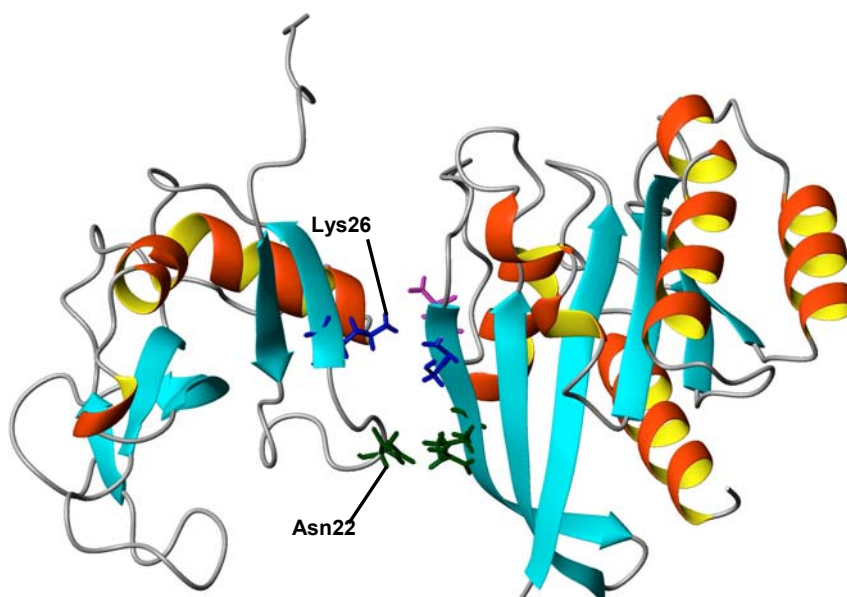
Die beiden Strukturen der RBDs wurden dabei an bestimmten Sekundärstrukturelementen beider Moleküle übereinandergelagert, bevorzugt an hochkonservierten Regionen, die sich aus dem sequentiellen Alignment ergaben. Eine detaillierte Übersicht dieser

übereinandergelagerten Aminosäuren aus beiden Molekülen ist der Tabelle 29 zu entnehmen:

AF6-RBD	AF6-RA
G 41 - Y46	G 10 - Y15
D 49	D 17
K 50	K 20
N 54 - T 65	N 22 - T 33
Q 69 - F 79	D 37 - Y 47
R 84 - L 86	R 61 - L 64
P 89	P 66

*Tabelle 29: Regionen in beiden Strukturen, die übereinandergelagert wurden.*

Die in der Tabelle 29 aufgelisteten Aminosäureregionen wurden in beiden Strukturen am Amidstickstoff und dem C $\alpha$  jeder aufgelisteten Aminosäure mit MOLMOL [Kor96] übereinandergelagert. Da die Überlagerung der AF6-RA an das im Komplex mit H-Ras gebundene AF6-RBD erfolgte, erhält man nach Entfernen der Struktur von AF6-RBD eine Vorstellung der relativen Lage von AF6-RA zu H-Ras, die in Abbildung 60 gezeigt wird.



*Abbildung 60: Modellvorstellung der Komplexstruktur zwischen AF6-RA (links) und H-Ras (rechts). Die farbig markierten Aminosäureseitenketten haben einen Abstand kleiner als 3 Å zu den Seitenketten des Interaktionspartners. Markierte H-Ras-Seitenketten von unten nach oben: Arg41, Ser39 und Asp38.*

Die Abbildung 60 zeigt, wie eine kleine Region auf der Oberfläche von AF6-RA mit dem Molekül H-Ras in Wechselwirkung treten könnte. Die im Vergleich zu AF6-RBD wegen der

kürzeren Sekundärstrukturelemente reduzierte Bindungsoberfläche von AF6-RA und die damit verbundenen wenigen Möglichkeiten, eine stabile Bindung zu H-Ras aufzubauen, könnte der Grund für die geringere Affinität von AF6-RA zu H-Ras sein.

Die hier vorgestellte Struktur von AF6-RBD ist ein weiterer Schritt zum Verständnis der Komplexbildung von Ras-Molekülen mit seinen Effektoren. Durch die Kenntnis der intermolekularen Wechselwirkungen, die einer Komplexbildung zugrunde liegen, lassen sich Wirkstoffe entwickeln, die selektiv fehlgeschaltete Signalwege blockieren können und damit den Organismus vor den Symptomen molekularer Erkrankungen bewahren.

## 7.2. Interaktion von AF6-RBD und H-Ras (s. 4.4.1)

Die Aufbereitung der Daten für die Komplexstrukturrechnung des AF6-RBD•H-Ras-Komplexes lieferte als Ergebnis eine Vorstellung davon, wie das AF6-Molekül mit H-Ras interagiert. Grundlage für die Analyse der für die Wechselwirkung in Frage kommenden Aminosäureresiduen in AF6 bildeten die Daten aus den Titrationsmessungen. Für das Amidproton einer Aminosäure, das im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum eine signifikante Änderung des Signalvolumens oder der chemischen Verschiebung zeigte, kann angenommen werden, dass es entweder direkt an der Wechselwirkung mit H-Ras beteiligt ist, oder durch die Komplexbildung eine konformationelle Änderung erfährt. Für die Berechnung eines Molekülkomplexes in einer möglichst naturgetreuen Strukturvorstellung ist es nötig, die in den Titrationsmessdaten enthaltenen Informationen hinsichtlich ihrer direkten Beteiligung an einer Wechselwirkung am Interaktionspartner zu selektieren. Aminosäuren in AF6, die lediglich eine konformationelle Änderung durch die Komplexbildung erfahren, sollten somit nicht in die Komplexstrukturberechnung mit HADDOCK [Dom03] einfließen. Ausschlusskriterien von signifikant aufgefallenen Aminosäuren können dabei die fehlende Zugehörigkeit zu einer zusammenhängenden Region auf der Moleküloberfläche beider Interaktionspartner sein. Liegt zudem die Seitenkette einer für die Interaktion in Frage kommenden Aminosäure an einer dem Lösungsmittel nicht zugänglichen Stelle, kann es für eine Beteiligung an der Wechselwirkung nicht in Betracht gezogen werden.

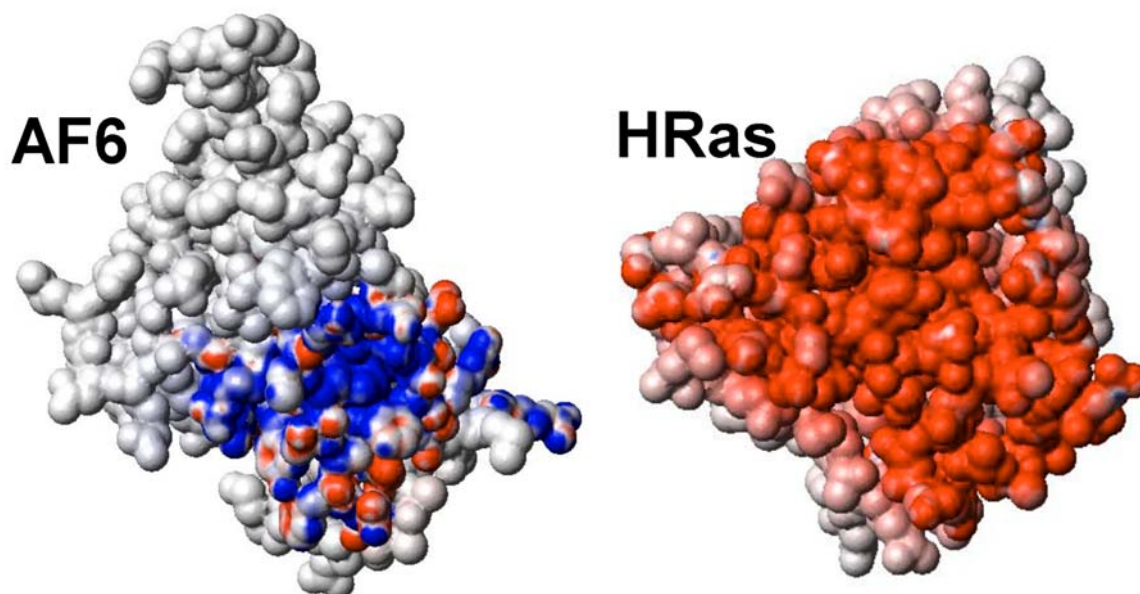


Abbildung 61: Die Darstellung zeigt das elektrostatische Oberflächenpotential der für die Komplexstrukturberechnung definierten Bindungsregionen beider Komplexpartner. Während die Interaktionsfläche von AF6 überwiegend positiv (in blau) geladen ist, zeigt die Bindungsregion von H-Ras ausschließlich negatives elektrostatisches Potential (rot).

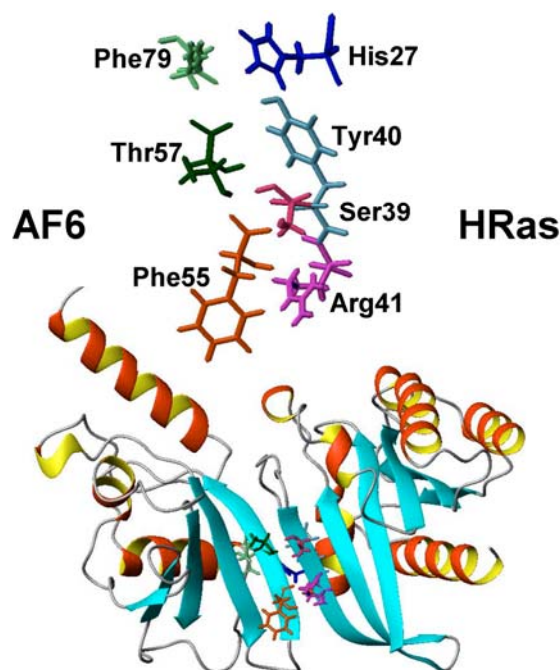
Von den 100 gerechneten und in Wasser verfeinerten Komplexstrukturen konnten 98 Strukturvorstellungen in zwei große Cluster mit jeweils 79 und 19 Strukturen eingeordnet werden. Ein Vergleich der prozentualen Häufigkeit der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen in den Strukturen beider Cluster zeigt, dass lediglich vier über Wasserstoffbrückenbindungen definierte Kontakte aus Cluster 1 mit den in Cluster 2 vorkommenden Kontakten übereinstimmen.

AF6			HRas		
AS-Nr.	AS	Atom	AS-Nr.	AS	Atom
23	ASN	O	32	TYR	HN
24	ARG	HE	33	ASP	OD1
24	ARG	HE	33	ASP	OD2
24	ARG	HH21	33	ASP	OD1

Tabelle 30: Übereinstimmende intermolekulare H-Kontakte im AF6-RBD•H-Ras-Komplex, die sich sowohl in der Kontaktliste von Cluster 1 als auch von Cluster 2 finden lassen.

Vergleicht man die Kontaktlisten der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Cluster 1 und 2, findet man neben Asn23 und Arg24 in AF6 auch die Aminosäuren Phe55, Thr57 und Phe79 in beiden Clustern, welche über intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen die Wechselwirkung mit H-Ras stabilisieren. Während Asn23 und Arg24

in beiden Clustern die gleichen Wechselwirkungen ausbilden, zeigen sich die durch Phe55, Thr57 und Phe79 stabilisierten Wechselwirkungen in beiden Clustern unterschiedlich. In Abbildung 62 wird die räumliche Lage der drei oben genannten Aminosäuren in ihrer Bindungsoberfläche im Cluster 1 gezeigt. Aus den 79 Strukturen des Clusters 1 wurde eine mittlere Struktur mit dem Programm MOLMOL berechnet (gezeigt im unteren Teil der Abbildung 62 als Bändermodell), aus der wiederum die hier dargestellte detaillierte Ansicht der Lage der interagierenden Aminosäuren zueinander im oberen Teil der Abbildung 62 gewonnen werden konnte.

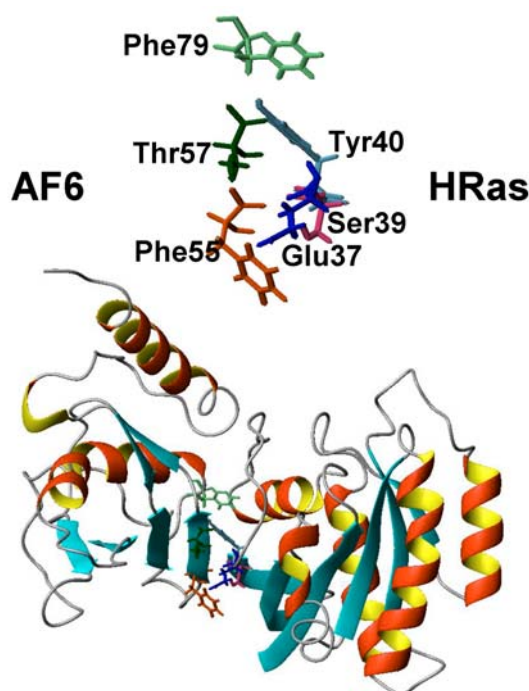


*Abbildung 62: Detaillierte Darstellung der räumlichen Lage der interagierenden Aminosäuren Phe55, Thr57 und Phe79 in AF6 mit ihren Bindungspartnern Arg41, Tyr40, Ser39 und His27 in H-Ras. Unten gezeigt ist die mittlere Komplexstruktur von Cluster 1 mit der Lage der hier diskutierten Aminosäuren in der Bindungsregion.*

Die aus Cluster 1 gerechnete mittlere Komplexstruktur zeigt sich hinsichtlich der Sekundärstrukturelemente der beiden interagierenden Moleküle gut definiert. Die Wechselwirkung zwischen AF6 und H-Ras wird durch ein intermolekulares antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt stabilisiert. Ein Vergleich der Analysen der intermolekularen H-Kontakte aller Strukturen in Cluster 1 und 2 ergab, dass Phe55, Thr57 und Phe79 in AF6 unterschiedliche Kontakte mit den Aminosäuren des Bindungspartners H-Ras ausbilden (Vergleiche hierzu Tabelle 6 und Tabelle 9). Dies verdeutlicht, wie unterschiedlich die aus einer Komplexstrukturrechnung hervorgehenden Strukturvorstellungen sein können. Die Clusteranalyse ermöglicht bei detaillierter Ansicht und Vergleich der gerechneten Strukturmodelle eine Entscheidung darüber, welche clusterbildende Strukturen eher einer realen Komplexstruktur entsprechen. Berechnet man aus den 19 Komplexstrukturen, die sich im Cluster 2 zusammenfassen lassen, eine mittlere Struktur, ergeben sich mit Ausnahme der Aminosäuren Asn23 und



Arg24 in AF6 ganz andere Kontakte mit den entsprechenden Residuen von H-Ras (vgl. hierzu Tabelle 9). Da auch in Cluster 2 die Aminosäuren Phe79, Thr57 und Phe55 von AF6 als kontaktbildend erkannt werden, lassen sich deren Kontakte mit denselbigen in Cluster 1 vergleichen. Das mittlere Strukturmodell des Cluster 2 zeigt für beide interagierende Moleküle eine unzureichende Definition der Sekundärstrukturelemente (gezeigt im unteren Teil der Abbildung 63 anhand eines Bändermodells). Die Ausbildung eines intermolekularen  $\beta$ -Faltblatts kann nicht gezeigt werden. Im oberen Teil der Abbildung 63 ist die Anordnung der Aminosäuren beider Interaktionspartner in der Weise gezeigt, wie sie sich aus der Kontaktliste des Cluster 2 ergibt. Das darunterliegende Bändermodell des Komplexes zeigt die Lage der an den Kontakten beteiligten Aminosäuren in der Komplexstruktur.

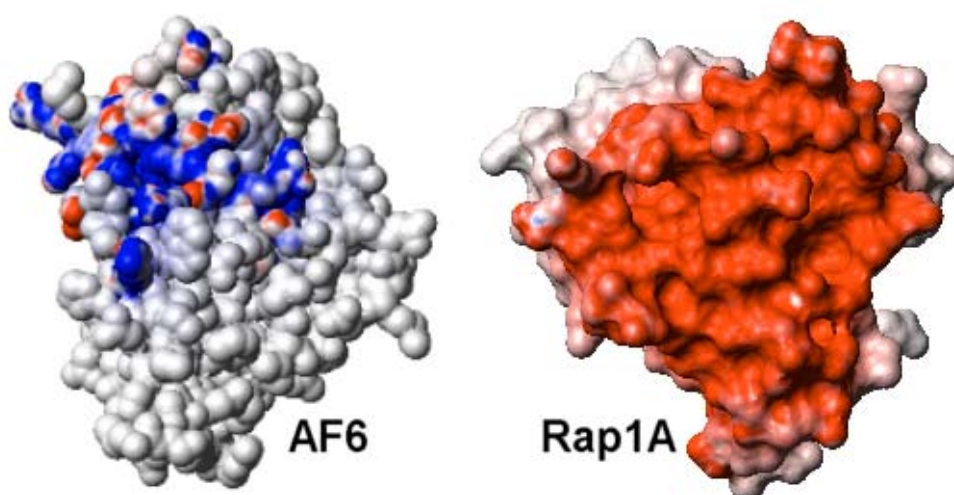


*Abbildung 63: Detaillierte Darstellung der räumlichen Lage der interagierenden Aminosäuren Phe55, Thr57 und Phe79 in AF6 mit ihren Bindungspartnern Ser39, Glu37 und Tyr40 in H-Ras, wie sie sich aus der Analyse der Bindungsregion der Strukturen aus Cluster 2 ergibt. Unten gezeigt ist die mittlere Komplexstruktur von Cluster 2 mit der Lage der hier diskutierten Aminosäuren in der Bindungsregion.*

Die Clusteranalyse ergab, dass sich mit 79 von 100 gerechneten Komplexstrukturen die Mehrzahl der Strukturen in Cluster 1 bündeln lässt. Man kann also sagen, dass ein Großteil der gerechneten Strukturvorstellungen zu einer einheitlichen Strukturvorstellung konvergiert. Dieses Modell entspricht der in Abbildung 63 im unteren Teil gezeigten Darstellung der Komplexstruktur. Die Wechselwirkung des Ras-Effektors AF6 erfolgt mit dessen Ras-Bindedomäne über ein intermolekulares antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt mit H-Ras in ähnlicher Weise, wie es aus den bisher strukturell aufgeklärten Komplexstrukturen anderer Ras-Effektoren mit ihrem Ras-Molekül bekannt ist.

### 7.3. Interaktion von AF6-RBD und Rap1A (s. 4.4.2)

Mit den Titrationsexperimenten als Grundlage zur Auswahl der Regionen in AF6, die an einer Interaktion mit Rap1A beteiligt sein können bekommt man mit den Ergebnissen aus der Docking-Simulationsrechnung ein detailliertes Bild davon, wie ein AF6-RBD•Rap1A-Komplex durch die entsprechenden intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Abbildung 64 stellt die Ladungsverteilung an den Bindungsflächen von AF6-RBD und Rap1A dar. Für beide Moleküle wurde das elektrostatische Oberflächenpotential aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich für die in der Dockingrechnung definierten Bindungsregionen jedes der beiden Moleküle berechnet und eingefärbt. Deutlich zu erkennen ist ein großes Cluster überwiegend positiver Ladungen in AF6, während die für die Bindung eines Effektormoleküls in Frage kommenden Regionen Switch I und Switch II in Rap1A negativ geladen sind.

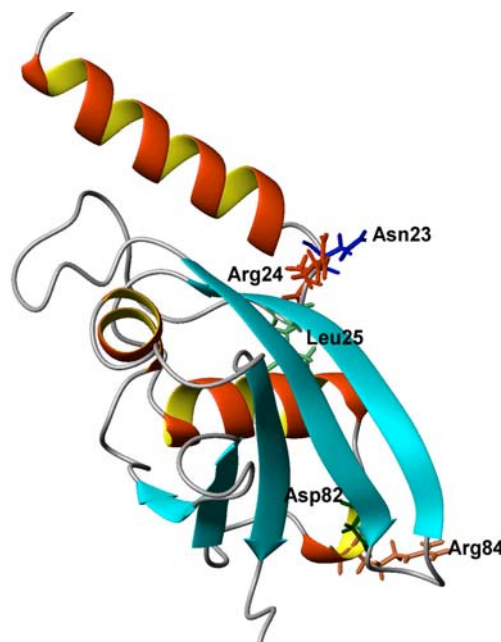


*Abbildung 64: Gezeigt ist hier das elektrostatische Oberflächenpotential der für die Komplexstrukturberechnung definierten Bindungsregionen beider Komplexpartner. Während die Interaktionsfläche von AF6 überwiegend positiv (in blau) geladen ist, zeigt die Bindungsregion von Rap1A nur negatives elektrostatisches Potential (rot).*

Ausgehend von 100 im Lösungsmittel Wasser gerechneten Komplexstrukturen konnten nach der Clusteranalyse insgesamt zwei größere Cluster mit jeweils 45 und 13 Strukturen ermittelt werden. Ein Vergleich der prozentualen Häufigkeit der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen in den Strukturen beider Cluster zeigt, dass sich nahezu alle in Cluster 2 gefundenen H-Kontakte auch in Cluster 1 finden lassen. Diese zeigen sich in AF6 im N-terminalen Bereich der Helix A1 (His19, Asn21), der darauffolgenden Loop-Region L1 (Asn23), dem  $\beta$ -Faltblatt B2 (Thr57, Lys58, Cys59) und der folgenden



Helix A2 (Glu77, Phe79). Diese Aminosäuren bilden mit Rap1A vorwiegend H-Kontakte in den Bereichen der beiden Switch-Regionen Switch I (AS 30-45) und Switch II (60-72) aus. Dabei fällt auf, dass Residuen in AF6, welche sich in der Region des  $\beta$ -Faltblatts B2 befinden, mit dem  $\beta$ -Faltblatt B2 in Rap1A intermolekulare H-Kontakte ausbilden. Insbesondere sind bei der Ausbildung eines intermolekularen  $\beta$ -Faltblatts zwischen den beiden Interaktionspartnern auf Seiten von Rap1A die Aminosäuren Asp33, Glu37, Asp38, Ser39, Tyr40 und Arg41 beteiligt. Die Residuen im Bereich der n-terminalen  $\alpha$ -Helix A1 von AF6 treten mit den Aminosäuren Glu62, Gln63 und Ala66 der Switch II-Region von Rap1A in Kontakt. Die Bindung der Aminosäure Asn23 kann anhand der Daten nicht erklärt werden, jedoch ermöglicht die Lage ihrer Seitenkette auf der AF6-Oberfläche durchaus H-Kontakte zu den Aminosäuren Ala59 und Glu62 von Rap1A. Abbildung 65 bildet AF6 nahezu in der Orientierung ab, in der es im Komplex mit Rap1A ausgerichtet ist. In der Abbildung sieht man deutlich, wie die Seitenkette von Asn23 (blau eingefärbt) in einer räumlichen Orientierung steht, die eine Interaktion ermöglicht. Die Abbildung erklärt auch, wie es möglich ist, dass die beiden sequentiell und räumlich benachbarten Residuen von Asn23, nämlich Arg24 und Leu25 nicht an einer Wechselwirkung beteiligt sind, obwohl für diese Aminosäuren laut Titrationsdaten signifikante Änderungen verzeichnet wurden.



*Abbildung 65: AF6, wie es im Komplex zu Rap1A orientiert ist. Die Abbildung soll zeigen, warum die Beteiligung der Aminosäure Asn24 an der Bindung mit Rap1A möglich sein kann, während bindungssignifikante Aminosäuren wie Arg24, Leu25, Asp82 und Arg84 keine Beteiligung an der Komplexbildung haben. Seitenketten von Asn23 in blau, Arg24 in rot, Leu25 in blaßgrün, Asp82 in dunkelgrün und Arg84 korallenfarben.*

Sowohl die Seitenketten von Arg24 (rot) als auch Leu25 (blaßgrün) haben eine für eine Wechselwirkung mit Rap1A ungünstige räumliche Orientierung, was die Erklärung liefern könnte, weshalb diese beiden Aminosäuren bei der Ausbildung des AF6-RBD•Rap1A-Komplexes unbeteiligt sind. Eine fehlende Orientierung der Seitenketten in den Raum hinein könnte auch der Grund für die fehlende Beteiligung der beiden Aminosäuren Asp82 (in dunkelgrün) und Arg84 (in korallenfarben) an einer Interaktion mit Rap1A sein.

## 7.4. Modellierung der Interaktion von AF6-RBD unter gleichen Bedingungen für die beiden Ras-Moleküle H-Ras und Rap1A

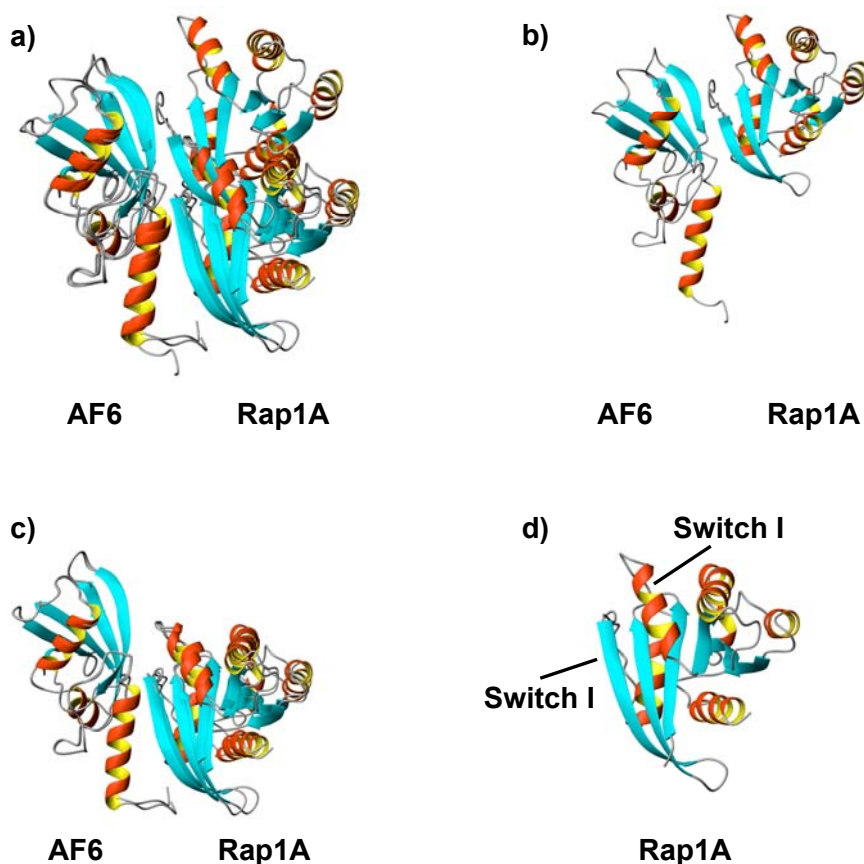
Die Ergebnisse der Abschnitte 4.5.1 und 4.5.2 sollen einen Beitrag zur Aufklärung der Frage leisten, ob die sequentiellen Unterschiede der Ras-Moleküle H-Ras und Rap1A dafür verantwortlich sind, dass sich die beiden Rasmolekül-Effektor-Komplexe AF6•H-Ras und AF6•Rap1A mit sehr unterschiedlichen Affinitäten zu einem AF6•Effektor-Komplex zusammenlagern. Neben den sequentiellen Unterschieden in den beiden Ras-Molekülen findet man auch Hinweise in den Auswertungen der Titrationsmessungen beim Vergleich des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrums von freiem AF6 verglichen mit dem Spektrum von im Komplex gebundenem AF6. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass bei der Ausbildung des AF6•H-Ras- und des AF6•Rap1A-Komplexes jeweils unterschiedliche Aminosäurereste in AF6 für die Stabilität des entsprechenden Molekülkomplexes sorgen. Die Beteiligung unterschiedlicher Aminosäuren von AF6 an der Wechselwirkung mit H-Ras bzw. Rap1A weist auf einen unterschiedlichen Wechselwirkungsmechanismus bei der Ausbildung der einzelnen Molekülkomplexe hin. Tabelle 31 soll einen Überblick über die gemeinsamen H-Brückenbindungen der drei Cluster der Strukturen von AF6•H-Ras und AF6•Rap1A geben. Dabei fällt auf, dass keine der H-Brückenbindungen, die im Cluster 1 von AF6•Rap1A vorkommen, in den anderen beiden Clustern 2 und 3 der Komplexstrukturen von AF6•Rap1A zu finden sind. Dagegen zeigen die 13 gleichen Wasserstoffbrückenbindungen von Cluster 2 und 3 von AF6•Rap1A, dass sich die Interaktionspartner im Komplex ähnlich ausrichten. Bei den Molekülkomplexstrukturen von AF6•H-Ras findet man in allen drei diskutierten Clustern 7 gleiche Wasserstoffbrückenbindungen, was auf eine gewisse Konvergenz der Komplexstrukturen hinweist.

gleiche H-Brückenbindungen in den Clustern von AF6•H-RAS und AF6•Rap1A											
AF6•H-RAS						AF6•Rap1A					
Cluster 1, 2 und 3						Cluster 2 und 3					
80	ARG	HH21	38	Asp	OD2	61	ARG	HH11	37	GLU	OE2
80	ARG	HH22	34	PRO	O	121	ASP	OD1	31	LYS	HZ2
80	ARG	HE	38	ASP	OD1	44	ARG	HH22	62	GLU	OE1
80	ARG	HH12	34	PRO	O	44	ARG	HH12	62	GLU	OE1
78	LYS	O	39	SER	HN	44	ARG	HH12	62	GLU	OE2
80	ARG	HH11	33	ASP	OD2	24	ARG	HH12	37	GLU	OE1
78	LYS	HZ1	37	GLU	OE2	44	ARG	HH21	35	THR	O
						61	ARG	HH22	38	ASP	OD1
Cluster 1 und 2						123	GLU	HN	33	ASP	OD1
78	LYS	HZ3	37	GLU	OE1	57	THR	HG1	63	GLN	OE1
24	ARG	HH22	3	GLU	OE1	61	ARG	HH22	38	ASP	OD2
						123	GLU	HN	33	ASP	OD2
Cluster 1 und 3						61	ARG	HH12	38	ASP	OD2
78	LYS	O	39	SER	HG						
Cluster 2 und 3											
57	THR	O	41	ARG	HE						
80	ARG	HH12	33	ASP	OD1						
80	ARG	HH21	38	ASP	OD1						
57	THR	O	41	ARG	HH21						
78	LYS	HZ1	37	GLU	OE1						

*Tabelle 31: Aufgelistet sind die H-Brückenbindungen, die in gleichen Clustern desselben Molekülkomplexes auftreten.*

Die Abbildung 65 b zeigt deutlich, was die Ergebnisse aus der Analyse der H-Brückenbindungen der einzelnen Cluster des AF6•Rap1A-Komplexes vermuten lassen: Der Cluster1 zeigt im Gegensatz zu Cluster 2 und 3, in denen die räumliche Ausrichtung beider beteiligter Interaktionspartner sehr ähnlich ist, keine Beteiligung von Aminosäureresiduen der n-terminalen  $\alpha$ -Helix. Das  $\beta$ -Faltblatt B2 von AF6 interagiert dabei mit der Switch I-Region von Rap1A. In Cluster 2 und 3, in dem nahezu gleiche Wasserstoffbrückenbindungen für die Ausbildung des Komplexes sorgen, findet die Wechselwirkung von AF6 und Rap1A sowohl zwischen den beiden  $\beta$ -Faltblättern B1, B2 und der Switch II-Region und dem Arg24 von

AF6 mit dem Glu37 der Switch I-Region statt. Es verwundert auch nicht, dass die Werte für die Gesamtenergie  $E_{\text{inter}}$  dieser beiden Cluster niedriger sind als die von Cluster 1 von AF6•Rap1A. Den entscheidenden Beitrag zur höheren Gesamtenergie von Cluster 1 liefert



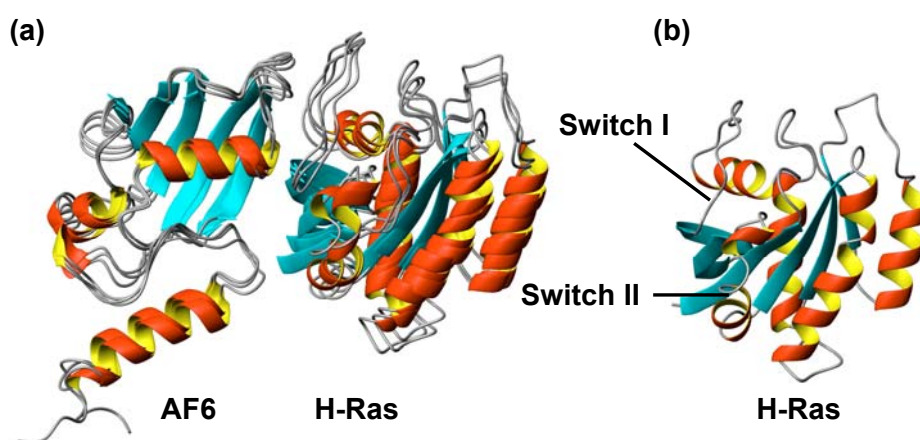
*Abbildung 66: In (a) ist ein strukturelles Alignment der jeweils energetisch besten AF6•Rap1A-Strukturen der Cluster 1, 2 und 3 gezeigt. Die Komplexstrukturen sind an den AF6-Residuen (7-131) gefittet. (b) zeigt die entsprechende Struktur von Cluster 1. (c) zeigt die Konvergenz der beiden besten Strukturen des Clusters 2 und 3 von AF6•Rap1A. (d) soll die räumliche Lage der Switch I und II-Region von Rap1A zeigen.*

die  $E_{\text{air}}$  aus den "Ambiguous Interaction Restraints". Das Dockingprotokoll von HADDOCK [Dom03] für den AF6•Rap1A-Komplex sieht vor, dass die aktiven Residuen Arg11, Asp15, Ile16, His18, His19 und Trp20 der n-terminalen  $\alpha$ -Helix von AF6 eine Wechselwirkung mit den Residuen von Rap1A vermitteln. Da jegliche Beteiligung der  $\alpha$ -Helix an der Stabilisierung des Molekülkomplexes fehlt, werden die nicht erfüllten AIRs mit einer Verletzungsenergie bestraft, welche durch ihren Beitrag die höhere Gesamtenergie der Komplexstrukturen in Cluster 1 erklärt.

Eine striktere Konvergenz findet man dagegen in den Strukturen der drei Cluster von AF6•H-Ras. In Abbildung 66 a ist jeweils die energetisch beste Struktur des AF6•H-Ras-Komplexes an den AF6-Residuen 7-131 übereinandergelagert dargestellt. Die Abweichungen der

Strukturen voneinander sind geringfügig, was sich bereits aus den sehr ähnlichen H-Brückenbindungen, die sich aus der Analyse der Strukturen der einzelnen Cluster 1-3 (s. Tabelle 19) ergaben, erahnen lässt.

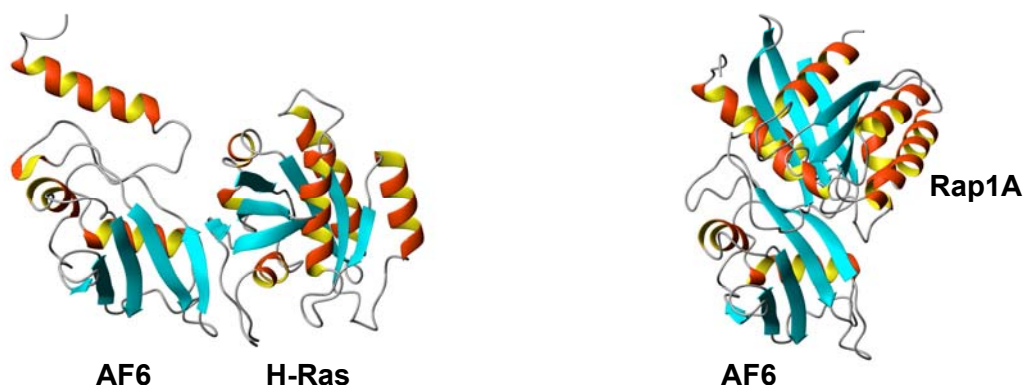
Der Analyse der Wasserstoffbrückenbindungen lässt sich eine auffällige Beteiligung des Lys78 und des Arg80 von AF6, beide im Bereich der  $\alpha$ -Helix A2 gelegen, entnehmen. Ebenso finden sich gehäufte Hinweise darauf, dass die Aminosäuren Arg44, Asn54 und Thr57 in den Bereichen der beiden  $\beta$ -Faltblätter B1 und B2 eine für die Stabilisierung des Komplexes wichtige Rolle spielen könnten. Auf Seiten von H-Ras finden alle Wechselwirkungen mit den Aminosäuren von AF6 ausschließlich in der Switch I-Region (AS 32-44) statt. Interessant ist in den Clustern 1 und 2 die Beteiligung des Arg24 von AF6, welches in der Loopregion nach der  $\alpha$ -Helix A1 und dem  $\beta$ -Faltblatt B1 lokalisiert ist. Auffällig ist die im Vergleich zu Cluster 1 und 3 sehr hohe durchschnittliche Gesamtenergie  $E_{\text{inter}}$  des AF6•H-Ras-Komplexes in Cluster 2, welche um das 2,2-fache höher liegt. Der Grund hierfür könnte in der Wechselwirkung des Lys58 (AF6) mit dem Ser39 (H-Ras) liegen, welche allerdings mit einer Häufigkeit von nur 28% im Cluster 2 einen relativ geringen Stellenwert hat. Dennoch stellt diese H-Brückenbindung eine große Ausnahme in den Clustern dar, da sie nur in Cluster 2 zu finden ist. Diese beiden Aminosäuren in AF6 und H-Ras stellen die einzige Wasserstoffbrückenbindung her, die sowohl in Cluster 2 von AF6•H-Ras als auch in Cluster 1 von AF6•Rap1A eine Rolle spielt.



*Abbildung 67: (a) zeigt ein strukturelles Alignment der jeweils energetisch besten AF6•H-Ras-Strukturen der Cluster 1, 2 und 3. Die Komplexstrukturen sind an den AF6-Residuen (7-131) gefittet. (b) soll die räumliche Lage der Switch I und II-Region von H-Ras in der gleichen Orientierung wie in (a) zeigen.*

Abschließend soll eine strukturelle Übereinanderlagerung der beiden Komplexe die räumliche Orientierung der beiden Komplexe von AF6•H-Ras und AF6•Rap1A veranschaulichen. Ausgewählt wurden für diesen Vergleich die besten Komplexstrukturen des Clusters 2 von AF6•Rap1A und des Clusters 1 von AF6•H-Ras. Da die beiden Cluster 2 und 3 hinsichtlich der Konvergenz ihrer Strukturen ein einheitliches Bild abgeben, wurde die

energetisch beste Struktur von AF6•Rap1A in Cluster 2 für das strukturelle Alignment ausgewählt. Diese Komplexstruktur wurde an die energetisch beste AF6•H-Ras-Struktur von Cluster 1 mit den Aminosäuren 7-131 von AF6 gefittet, da im Falle von AF6•H-Ras alle Strukturen der drei Cluster ähnlich konvergieren.



*Abbildung 68: Der Molekülkomplex in der linken Hälfte zeigt AF6•H-Ras. Rechts sieht man im Vergleich dazu den AF6•Rap1A-Komplex. In beiden gezeigten Komplexen ist die räumliche Orientierung des AF6-Moleküls gleich.*

Die Abbildung 68 zeigt deutlich, wie wenig sich die beiden Komplexe ähneln. Rap1A bildet mit AF6 keine H-Brückenbindungen aus, die hinsichtlich der daran beteiligten Aminosäuren mit denen des AF6•H-Ras-Komplexes Gemeinsamkeiten haben. Die im Dockingprotokoll geforderte, aber nicht erfüllte Beteiligung der Residuen Arg11, Asp15, Ile16, His18, His19 und Trp20 der n-terminalen  $\alpha$ -Helix von AF6 an der Komplexbildung führt vermutlich zu einem fehlerhaften Docking der beiden Interaktionspartner AF6 und Rap1A. Eine höhere Gewichtung zweier wechselwirkender Aminosäuren in jeweils einem der beiden Moleküle könnte die Zusammenlagerung der beiden Interaktionspartner in der Dockingsimulation in eine Richtung lenken, die den bisher bekannten Ras-Effektor-Komplexen ähnelt. In diesem Fall würde die Kontaktstellenanalyse (H-Bonds) der erhaltenen Strukturen im Vergleich zu den bekannten Kontakten aus den Ras-Effektor-Komplexen ein Plausibilitätskriterium für die erhaltenen Komplexstrukturen liefern.



## 7.5. Strukturverfeinerung von Byr2-RBD

Die NMR-Lösungsstruktur der Byr2-RBD wurde basierend auf einer fast vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebungen für das Proteinrückgrat strukturell durch ein homonukleares 2D-NOESY-Spektrum verfeinert. Lediglich die chemischen Verschiebungen für die Aminosäuren S84, R90, S91 und E93 fehlen in der Zuordnung. Von den  $H^\alpha$  sind 90% und von den  $H^\beta$  67% der Kerne zugeordnet, welche die Grundlage für die Zuordnung zusätzlicher NOE-Signale im 2D-Spektrum bildeten. Für die Struktur von Byr2-RBD existierten vor der Strukturverbesserung insgesamt 824 NOE-Abstandsbeschränkungen für die Strukturrechnung. Die mit dieser geringen Anzahl von Distanzbeschränkungen erzeugten Strukturen konvergierten zwar in einem Ensemble von gerechneten Strukturen zu einem einheitlichen Strukturbündel, jedoch zeigte sich dieses im Hinblick auf seine Sekundärstrukturelemente und die diese verbindenden Loop-Regionen als schlecht definiert. Um die hier vorgestellte Lösungsstruktur der Ras-Bindedomäne von Byr2 hinsichtlich einer exakteren Definition ihrer Sekundärstrukturelemente und ihrer Konvergenz in einem Strukturbündel zu verbessern, war es notwendig, zusätzliche NOE-Abstandsbeschränkungen für die Strukturrechnung zu finden.

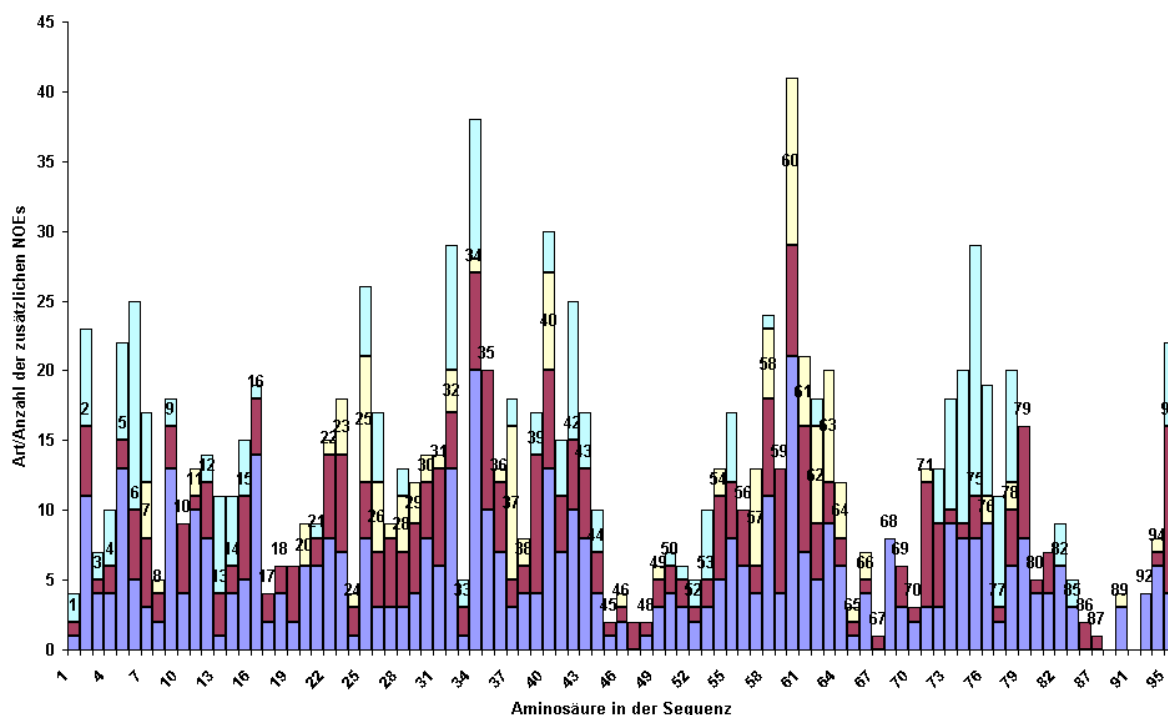
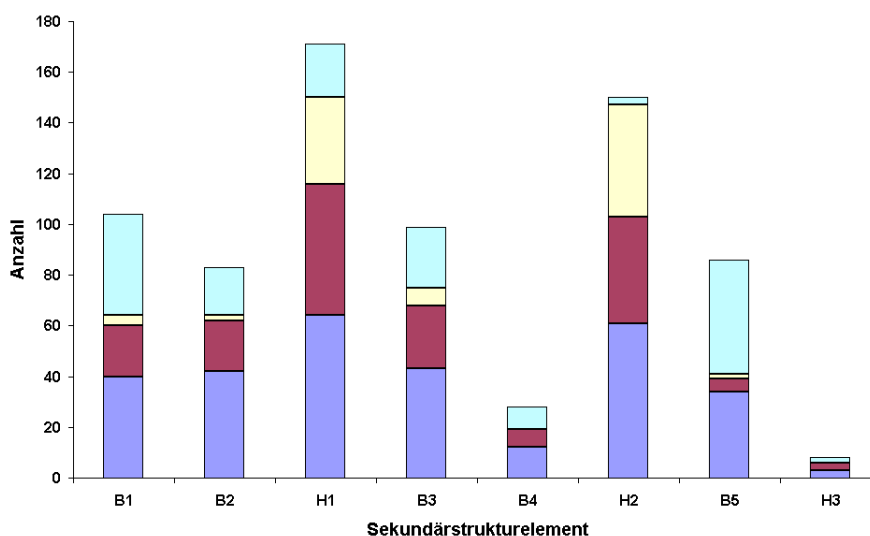


Abbildung 69: Darstellung von Art und Anzahl der zusätzlich gefundenen NOE-Signale im Rahmen der Strukturverfeinerung von Byr2-RBD. Jede gefundene Zuordnung einer Aminosäure in der Byr2-Sequenz wird in der Ansicht ihrer Distanzkategorie zugeordnet. (blau: intraresiduell, rot: sequentiell, gelb: mittelreichweitig, türkis: langreichweitig).



Signale von NOE-Kontakten im Spektrum, die richtig zugeordnet werden, würden in einer erneuten Strukturrechnung eine exakter definierte Lösungsstruktur hervorbringen, welche für weitere strukturelle Untersuchungen verwendet werden könnte.

Aufgrund der hohen Dichte sich teilweise überlappender Signale in dem 2D-NOESY-Spektrum gestaltete sich die Zuordnung der Signale äußerst schwierig. Insgesamt konnten 1197 zusätzliche NOE-Signale zugeordnet und als Abstandsbeschränkungen in die Strukturrechnung mit dem Moleküldynamikprogramm CNS einfließen. Neben den vielen intra-residualen NOE-Kontakten konnten vor allem auch NOE-Signale von sequentiell benachbarten und langreichweitigen Korrelationen gefunden werden. Letztere könnten maßgeblich zu einer besseren Konvergenz der die Sekundärstrukturelemente verbindenden Loopregionen beigetragen haben. Für die Regionen der Sekundärstrukturelemente konnten insgesamt 729 neue NOE-Kontakte für die Strukturrechnung gefunden werden. Aufgrund der hohen Abstandssensitivität der NOE-Signale konnten für die intramolekularen Kontakte (blau in Abbildung 70) mit 299 zusätzlichen Kontakten die meisten Distanzbeschränkungen für die Strukturrechnung gefunden werden. Ebenso konnten in den Spektren für die unten gezeigten Strukturregionen neben den 93 mittelreichweitigen noch zahlreiche sequentielle und langreichweitige Kontakte zugeordnet werden.



*Abbildung 70: Detaillierte Übersicht über Art und Anzahl der neu zugeordneten NOEs für die einzelnen Sekundärstrukturelemente von Byr2. ( $\alpha$ -Helices H1 (AS 22-32), H2 (AS 57-63), H3 (AS 84-88),  $\beta$ -Faltblätter B1 (AS 2-7), B2 (AS 11-16), B3 (AS 40-45), B4 (AS 50-53) und B5 (AS 73-76)); Farbcode der Diagrammsäulen: blau: intraresiduell, rot: sequentiell, gelb: mittelreichweitig, türkis: langreichweitig).*

Abschließend sollte zur Anzahl gefundener neuer Distanzbeschränkungen sowohl für die AF6-RBD als auch für die RBD von Byr2 erwähnt werden, dass sich die gezeigten neu

gefundenen Kontakte für jede Aminosäure bzw. jedes Sekundärstrukturelement nur aus Einfachnennungen aufsummieren und somit die Kontaktliste von Redundanzen in den einzelnen Abstandsbeschränkungen bereinigt ist.

Die Berechnung der verfeinerten Byr2-Struktur lieferte im Vergleich zur ehemaligen Struktur einen besseren R-Wert, wenn man ihn auf alle Signale bezieht. Vergleicht man jedoch die einzelnen Distanzklassen des R-Wertes vor und nach der Strukturverfeinerung, verschlechtert sich dieser in den Distanzklassen sequentielle Signale, mittelreichweitige Signale, langreichweitige Signale und interresiduelle Signale. Lediglich in der R-Wert-Kategorie "intraresiduelle Signale" hat sich der R-Wert verbessert. Dieses Phänomen lässt sich mit der höheren Auflösung von NOE-Signalen für die intraresiduellen Signale begründen. Der geringe räumlichen Abstand der Protonen, die innerhalb derselben Aminosäure liegen, führt wegen der Distanzabhängigkeit im NOE-Experiment zu einem starken NOE-Signal im NOESY-Spektrum. Folglich heben sich diese deutlicher von Rauschsignalen oder Artefakten, welche echte NOE-Signale überlagern, ab. Daher ist eine Zuordnung von Signalen, die aus räumlich benachbarten Protonenkorrelationen herrühren, wesentlich sicherer, was sich anhand des besseren R-Wertes der Kategorie "intraresiduelle Signale" für Byr2-RBD nachvollziehen lässt.

Die verbesserte NMR-Struktur von Byr2-RBD liefert eine Grundlage für weitere Untersuchungen von Wechselwirkungen, die Ras-Moleküle mit ihren Effektoren bei der Komplexbildung eingehen.

## 7.6. Die sequentielle Zuordnung von Nore1-RBD

Die sequentielle Zuordnung jedes der Hauptkettenatome der Aminosäurreste einer Proteindomäne bildet die Grundlage für die Zuordnung der Seitenketten der einzelnen Aminosäuren des untersuchten Proteins. Mit weiteren experimentellen Verfahren und Analysen wie z.B. der Messung von 2D- und 3D-NOESY-Experimenten und deren Spektralanalyse erhält man u. a. im nächsten Schritt die wichtigen Abstandsbeschränkungen für die Berechnung der Tertiärstruktur des Proteins. Die in dieser Arbeit untersuchte Ras-Bindedomäne von Nore1 ist mit einer Länge von 160 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von über 18 kDa den herkömmlichen NMR-Experimenten nur schwer zugänglich. Aus diesem Grund wurde zur besseren Auflösung der Signale das TROSY-Experiment (transverse relaxation-optimized spectroscopy) mit den im Methoden- und Ergebnisteil beschriebenen dreidimensionalen HNCA-, CBCANH-, CBCA(CO)NH- und HN(CO)CA-Experimenten vereinigt. Mit der TROSY-Sequenz erreicht man durch Unterdrückung der transversalen Relaxation eine signifikante Schmälerung der Linienbreiten. So vielversprechend diese Methode auch sein mag, bei der Zuordnung der Hauptkettenatome von Nore1-RBD führte sie nur zu bedingtem Erfolg. In den Spektren kam es in bestimmten Regionen (z. B. 7,7-8,7 ppm  $^1\text{H}$ -Verschiebung und 117-

126,5 ppm  $^{15}\text{N}$  – Verschiebung) zu erheblichen Signalüberlagerungen, was zur Folge hatte, dass für diese Hauptkettenatome keine sichere Zuordnung für die Aminosäuren in der Sequenz möglich war. Eine Abhilfe für das Problem der starken Signalüberlappung in den Spektren von Nore1-RBD könnte die Verwendung einer perdeuterierten Nore1-Probe bedeuten. Die sich in der wässrigen Probenlösung nicht mit den Protonen austauschenden Kohlenstoff-Protonen des Proteins könnten bei einer derartig behandelten Probe zu einer deutlichen Verringerung der Signale im NMR-Spektrum beitragen. Als NMR-Signal sichtbar wären nur noch die  $\text{N}^{\text{H}}$ -Protonen der einzelnen Aminosäuren und die Amidprotonen der Seitenketten der Aminosäuren Arg, Lys, His, Gln und Asn. Zusätzlich würde durch eine Verschmälerung der Linienbreiten aufgrund der resultierenden Zunahme der  $T_2$ -Relaxationszeit der Protonenspins ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis erreicht werden, was zu einer besseren Zuordnung der Amidprotonensignale im NMR-Spektrum führen würde. Die an dieser Stelle beschriebene Möglichkeit, mit der Änderung der Probenzusammensetzung durch Deuterierung der nicht austauschbaren Protonen ein vorher nicht aufklärbares Protein in seiner Struktur analysieren zu können, ist nur ein kleiner Ausschnitt des Spektrums an Möglichkeiten, welche die NMR-Spektroskopie in Bezug auf den Einsatz vielfältiger Methoden und Experimente zu bieten hat.

## 8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Strukturen der Ras-Bindedomänen der Ras-Effektoren von AF6 (rnAF6) und Byr2 vorgestellt. Ebenfalls gezeigt werden die Ergebnisse aus der sequentiellen Zuordnung der NMR-Signale des "novel ras effector" Nore1-RBD. Ein weiterer wichtiger Teil der Arbeit befasst sich mit der NMR-basierten Berechnung von Komplexstrukturen des Ras-Effektors AF6-RBD mit den beiden kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A.

Die dreidimensionale NMR-Lösungsstruktur der Ras-Bindedomäne von AF6, welche die Grundlage für die Komplexstrukturrechnungen von AF6•H-Ras und AF6•Rap1A bildete, wurde unter Verwendung von NOE-Kontakten, Wasserstoffbrücken und Winkelbeschränkungen gewonnen. Es stellte sich heraus, dass der Kernbereich der Domäne von AF6-RBD (Reste 6-130) eine gut definierte Faltung aufweist. Die Anordnung der Sekundärstrukturelemente in der Sequenz des Moleküls erwies sich in weiten Teilen als identisch mit den von anderen bereits bekannten Strukturen Ras-bindender Domänen (z.B. Rgl, RalGDS, Rlf und c-Raf). Moleküle dieser Gruppe sind von einem gemeinsamen Faltungsmotiv, dem sogenannten Ubiquitin  $\alpha/\beta$  roll, gekennzeichnet. Moleküle mit diesem gemeinsamen Merkmal haben im Kernbereich ihrer Struktur ein fünfsträngiges gemischtes antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, welches von zwei  $\alpha$ -Helices ergänzt wird. Im Unterschied zu den übrigen Ras-Bindungsdomänen findet man bei der RBD von AF6 noch eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix und eine längere Loopregion im n-terminalen Bereich des Proteins, was als eine Erweiterung der Faltungsklasse gewertet werden kann. Eine weitere Auffälligkeit in der Struktur von AF6-RBD lässt sich im Vergleich zu den bisher bekannten Strukturen anderer Ras-Bindedomänen in der Länge der einzelnen Sekundärstrukturelemente finden.

Die NMR-Struktur von AF6-RBD bildete die Grundlage zur Untersuchung des AF6•HRas- und AF6•Rap1a-Komplexes. Es gelang in beiden Fällen für die Rasbindedomäne von AF6 eine zusammenhängende Bindungsstelle zu definieren. In dieser Arbeit werden für jeweils einen AF6-Komplex zwei verschiedene Ansätze von Dockingsimulationen vorgestellt, die sich zum einen hinsichtlich der definierten Oberfläche in AF6-RBD und den beiden GTPasen und zum anderen in der Beweglichkeit der für die Wechselwirkung von Bedeutung erscheinenden Sekundärstrukturelemente beider Interaktionspartner unterscheiden. Es konnte im ersten Dockingansatz gezeigt werden, dass beide Komplexe von AF6 mit H-Ras oder mit Rap1A durch ein intermolekulares antiparalleles  $\beta$ -Faltblattsystem stabilisiert werden. Das Ergebnis des zweiten Dockingverfahrens zeigt, wie die N-terminale  $\alpha$ -Helix der RBD von AF6 die Wechselwirkungen mit H-Ras und Rap1A beeinflussen.

Mit dieser Arbeit gelang die Definition und Etablierung von Protokollen zur Berechnung von Molekülkomplexen von Raseffektoren und ihrer beiden GTPasen H-Ras und Rap1A. Aus den Ergebnissen der Moleküldynamiksimulationen zur Berechnung der Komplexstrukturen, deren Grundlage die beiden erwähnten Dockingansätze bildeten, läßt sich ableiten, daß sich aus einer Kombination aus wissensbasiertem Dockingansatz und der Erhaltung der vollkommenen Beweglichkeit der an der Komplexbildung beteiligten Sekundärstrukturelemente ein realitätsnahes Bild der Wechselwirkungen eines Raseffektor-Molekülkomplexes berechnen ließe.

Die Ras-Bindedomäne des Proteins Byr2 vermittelt in der Zelle des niederen Eukaryots *Schizosaccharomyces pombe* durch eine Wechselwirkung mit dem einzigen Rasprotein Ras1 der Spalthefe eine Proteinkinase, die weitere Kinaseaktivitäten stimuliert. Die dreidimensionale NMR-Struktur der Byr2-RBD wurde in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer atomaren Auflösung strukturell verfeinert. Die Sekundärstrukturelemente der untersuchten und verfeinerten Proteindomäne sind in der bekannten Ubiquitin-Faltung angeordnet. Ein fünfsträngiges gemischtes, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt wird in Byr2-RBD von zwei  $\alpha$ -Helices ergänzt. Mit der Zuordnung weiterer 1197 NOE-Signale gelang es, eine Vorstellung der Struktur von Byr2-RBD zu berechnen, die eine eindeutige Faltung aufweist (RMSD-Wert: 0,81).

Nore1 (abgeleitet von *novel ras effector*) ist ein Effektor von H-Ras, der vermutlich in der Organisation von Mikrotubuli-Netzwerken eine Rolle spielt. Unter Verwendung von 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-, und 3D TROSY-HNCA-, TROSY-CBCANH-, TROSY-CBCA(CO)NH-, TROSY-HN(CO)CA-Spektren konnten die Resonanzfrequenzen von 40 Aminosäuren der Kerne des Proteinrückgrats zugeordnet werden. Für 32 Aminosäuren konnten die Resonanzfrequenzen des eigenen  $\text{C}\alpha$  und  $\text{C}\beta$  sowie die des sequentiellen Vorgängers ermittelt werden. Insgesamt konnten durch die Analyse des TROSY-HNCA-Spektrums 103 Spinsysteme der 160 Aminosäuren langen und ca. 18,6 kDa schweren Proteindomäne separiert werden.

## 9. Literatur

- [ Ael93 ] van Aelst L., Barr M., Marcus S., Polverino A., Wigler M. (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90. 6213-6217.
- [ Ael94 ] van Aelst L., White M.A., Wigler M.H., (1994). Ras partners. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59. 181-186.
- [ Ahm97 ] Ahmadian M.R., Hoffmann U., Goody R.S., Wittinghofer A. (1997). Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 36, 4535-4541.
- [ And96 ] Ando-Akatsuka Y., Yonemura S., Itoh M., Furuse M., Tsukita S. (1996). Differential behavior of E-cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial cell polarity. *J. Cell. Physiol.* 179. 115-125.
- [ Alb97 ] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1997). *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim.
- [ Arn51 ] Arnold J.T., Dharmatti S.S., Packard M.E. (1951). *J. Chem. Phys.* 19. 507
- [ Asa99 ] Asakura T., Nakanishi H., Sakisaka T., Takahashi K., Mandai K., Nishimura M., Sasaki T., Takai Y. (1999). Similar and differential behavior between the nectin-afadin-ponsin and cadherin-catenin systems during the formation and disruption of polarized junctional alignment in epithelial cells. *Genes Cells* 4. 573-581.
- [ AUR04 ] Gronwald W., Kalbitzer H.R. (2004). Automated Structure Determination of Proteins by NMR Spectroscopy *Prog. NMR Spectrosc.* 44. 33-96
- [ Bar87 ] Barbacid M. (1987). Ras Genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 779-827.
- [ Barr96 ] Barr M.M., Tu H., Van Aelst L., Wigler M. (1996). Identification of Ste4 as a potential regulator of Byr2 in the sexual response pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 16. 5597-5603.
- [ Bau98 ] Baumann P., Albright C.F. (1988). Funktional analysis of domains in the Byr2 kinase. *Biochemie* 80. 621-625.
- [ Bil98 ] Bilan P.J., Moyers J.S., Kahn C.R. (1998). The ras-related protein rad associates with the Zytoskeleton in a non-lipid-dependent manner. *Exp. Cell Res.* 242. 391-400.
- [ Boe00 ] Boettner B., Govek E.E., Cross J., Van Aelst L. (2000). The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin Zytoskeletal regulator profilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97. 9064-9069.
- [ Bos97 ] Bos J.L. (1997). Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta.* 1333(2). M19-31.
- [ Bos89 ] Bos J.L. (1989). Ras Onkogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49. 4682-4689.
- [ Bru87 ] Brünger, A.T., Kuriyan, J., Karplus, M. (1987). Crystallographic R Factor Refinement by Molecular Dynamics. *Science* 235. 458-460

- [ Bru92 ] Brünger A.T. (1992). X-PLOR Manual Version 3.0. Yale University Press, New Haven.
- [ Bru98 ] Brünger A.T., Adams P.D., Clore G.M., DeLano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve R.W., Jiang J.-S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T, Warren G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* 54. 905-924.
- [ Byr01 ] Huber F. (2001). Dissertation. Universität Regensburg
- [ Cha94 ] Chadeneau C., LeMoullac B., Denis M.G. (1994). A novel member of the immunoglobulin gene superfamily expressed in rat carcinoma cell lines. *J. Biol. Chem.* 269.15601–15605.
- [ Cor67 ] Cornfield J. (1967) *Rev. Int. Statist. Inst.* 35. 34-49.
- [ Cor69 ] Cornfield J. (1969). The Bayesian outlook and its application. *Biometrics* 25. 617-642.
- [ Cor99 ] Cornilescu G., Delagio F., Bax A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR.* 13. 289-302.
- [ Cre96 ] Creasy C.L., Ambrose D.M., Chernoff J. (1996) The Ste20-like protein kinase, Mst1, dimerizes and contains an inhibitory domain. *J. Biol. Chem.* 271. 21049-21053.
- [ Dal04 ] Dallol A., Agathangelou A., Fenton S.L., Ahmed-Choudhury J., Hesson L., Vos M.D., Clark G.J., Downward J., Maher E.R., Latif F. (2004). RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer Res.* 15. 4112-4116.
- [ Dal05 ] Dallol A., Agathangelou A., Tommasi S., Pfeifer G.P., Maher E.R., Latif F. (2005). Involvement of the RASSF1A tumor suppressor gene in controlling cell migration. *Cancer Res.* 65. 7653-7659.
- [ Dam00 ] Dammann R., Li C., Yoon J. H., Chin P. L., Bates S., Pfeifer G. P. (2000) Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat. Genet.* 25: 315-319.
- [ Dom03 ] Dominguez C., Boelens R., Bonvin A.M. (2003). HADDOCK: A Protein-Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *J. am. chem. soc.* 125. 1731-1737.
- [ DPS ] <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>
- [ Ern87 ] Ernst R. R., Bodenhausen G., Wokaun A. (1987). Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. Clarendon Press, Oxford.
- [ Fiau02 ] Fiaux J., Bertelsen E.B., Horwich A.L., Wüthrich K. (2002). NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature* 418. 207-211.
- [ Fuk86 ] Fukui Y., Kozasa T., Kaziro Y., Takeda T., Yamamoto M. (1986). Role of a ras homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell* 44. 329-336.
- [ Goh03 ] Gohlke H., Kiel C., Case D.A. (2003). Insights into Protein-Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS Complexes. *J. Mol. Biol.* 330. 891-913.



- 
- [ Gri88 ] Oschkinat H., Griesinger C., Kraulis P.J., Sorensen O.W., Ernst R.R., Gronenborn A.M., Clore G.M. (1988). Three-dimensional NMR spectroscopy of a protein in solution. *Nature* 332. 374-376.
- [ Gro00 ] Gronwald W., Kirchhöfer R., Görler A., Kremer W., Ganslmeier B., Neidig K. P., Kalbitzer H. R. (2000). RFAC, a program for automated NMR R-factor estimation. *J. Biomol. NMR* 17. 137-151.
- [ Gro94 ] Gronwald W. Dissertation. TU Braunschweig (1994).
- [ Hor96 ] Horn G. (1996). Untersuchungen zur Funktion und Struktur des ras-homologen Proteins Rap1A. Dissertation, Bochum.
- [ Hir98 ] Hirose E., Nakashima N., Sekiguchi T., Nishimoto T. (1998). RagA is a functional homologue of *S. cerevisiae* Gtr1p involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway. *J. Cell Sci.* 111. 11-21.
- [ Hoo96 ] Hooft R.W., Vriend G., Sander C., Abola E.E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381. 272.
- [ Hub01 ] Huber F. (2001). Dissertation. Universität Regensburg.
- [ Ike99 ] Ikeda W., Nakanishi H., Miyoshi J., Mandai K., Ishizaki H., Tanaka M., Togawa A., Takahashi K., Nishioka K., Yoshida H., Mizoguchi A., Nishikawa S., Takai, Y. (1999). Afadin: a key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J. Cell Biol.* 146, 1117–1131
- [ Jack00 ] Jackson C.L., Casanova J.E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in Cell Biology* 10. 60-67.
- [ Jee71 ] Jeener J. (1971). II. Ampere International Summer School, Basko Polje, Jugoslawien.
- [ Kay90 ] Kay L. E., Clore G. M., Bax A., Gronenborn A. M. (1990). Four-dimensional heteronuclear triple-resonance NMR spectroscopy of interleukin-1 beta in solution. *Science* 249. 411-414.
- [ Kho02 ] Khokhlatchev A., Rabizadeh S., Xavier R., Nedwidek M., Chen T., Zhang X.F., Seed B., Avruch J. (2002). Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr. Biol.* 12 253-265.
- [ Kit91 ] Kitamura K., Simoda C. (1991). The *Schizosaccharomyces pombe* mam2 gene encodes a putative pheromone receptor which has a significant homology with the *Saccharomyces* Ste2 protein. *The EMBO Journal* 10. 3743-3751.
- [ Kor96 ] Koradi R., Billeter M., Wüthrich K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* 14. 51-55, 29-32.
- [ Kur96 ] Kuriyama M., Harada N., Kuroda S., Yamamoto T., Nakafuku M., Iwamatsu A., Yamamoto D., Prasad R., Croce C., Canaani E., Kaibuchi K. (1996). Identification of AF-6 and canoe as putative targets for Ras. *J. Biol. Chem.* 271. 607-610.
- [ Las93 ] Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S. Thornton J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26. 283-291.
- [ Lee96 ] Lee C.H., Della N.G., Chew C.E., Zack D.J. (1996). Rin, a neuron-specific and calmodulin-binding small G-protein, and Rit define a novel subfamily of ras proteins. *J. Neurosci.* 16. 6784-6794.
-

- 
- [ Lin03 ] Linge J.P., Williams M.A., Spronk C.A., Bonvin A.M., Nilges M. (2003). Refinement of protein structures in explicit solvent. *Proteins* 50. 496-506.
- [ Lin99 ] Linge J.P., Nilges M. (1999). Influence of non-bonded parameters on the quality of NMR structures: a new force field for NMR structure calculation. *J. Biomol. NMR* 13. 51-59.
- [ Lin99a ] Linnemann Thomas (1999). Dissertation, MPI Dortmund
- [ Low93 ] Lowy D.R., Willumsen B.M. (1993). Function and regulation of ras. *Annual Review of Biochemistry* 62. 851-891.
- [ Mack98 ] Mackay D.J., Hall A. (1998). Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 273. 20685-20688.
- [ Man97 ] Mandai K., Nakanishi H., Satoh A., Obaishi H., Wada M., Nishioka H., Itoh M., Mizoguchi A., Aoki T., Fujimoto T., Matsuda Y., Tsukita S., Takai Y. (1997). Afadin: a novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J. Cell Biol.* 139, 517-528
- [ Man99 ] Mandai K., Nakanishi H., Satoh A., Takahashi T., Satoh K., Nishioka H., Mizoguchi A., Takai Y. (1999). Ponsin/SH3P12: an I-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J. Cell Biol.* 144, 1001-1017
- [ Mas95 ] Masuda T., Kariya K., Shinkai M., Okada T., Kataoka T. (1995). Protein kinase Byr2 is a target of Ras1 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 270. 1979-1982.
- [ Mil90 ] Milburn M.V., Tong L. deVos A.M., Brunger A., Yamaizumi Z., Nishimura S., Kim S.H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protoOncogenic Ras proteins. *Science* 247. 939-945.
- [ Moo98 ] Moore M.S. (1998). Ran and nuclear transport. *J. Biol. Chem.* 273. 22857-22860.
- [ Mos06 ] Moshnikova A., Frye J., Shay J.W., Minna J.D., Khokhlatchev A.V. (2006). The growth and tumor suppressor NORE1A is a Zytoskeletal protein that suppresses growth by inhibition of the ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 281. 8143-8152.
- [ Mos98 ] Moss J., Vougham M., (1998). Molecules in the ARF orbit. *J. Biol. Chem.* 273, 21431-21434.
- [ Myo05 ] Miyoshi J., Takai Y. (2005). Review: Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57. 815-55.
- [ Nab04 ] Nabuurs S.B., Nederveen A.J., Vranken W., Doreleijers J.F., Bonvin A.M., Vuister G.W., Vriend G., Spronk C.A. (2004). DRESS: a database of REfined solution NMR structures. *Proteins* 55. 483-486.
- [ Nad86 ] Nadin-Davis S.A., Nasim A., Beach D. (1986). Involvement of ras in sexual differentiation but not in growth control in fission yeast. *EMBO J.* 11. 2963-2971.
- [ Nad88 ] Nadin-Davis S.A., Nasim A. (1988). A gene which encodes a predicted protein kinase can restore some function of the ras gene in fission yeast. *EMBO J.* 7. 985-993.
- [ Nas95 ] Nassar N., Horn G., Herrmann C., Scherer A., McCormick F., Wittinghofer A. (1995). The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* 375. 554-560.
-

- [ Oba91 ] Obara T., Nakafuku M., Yamamoto M., Kaziro Y. (1991). Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein alpha subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: involvement in mating and sporulation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88. 5877-5881.
- [ Oka91 ] Okazaki N., Okazaki K., Tanaka K., Okayama H. (1991). The *ste4+* gene, essential for sexual differentiation of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes a protein with a leucine zipper motif. *Nuc. Acids Res.* 19. 7043-7047.
- [ Ort02 ] Ortiz-Vega S., Khokhlatchev A., Nedwiedek M., Zhang X. F., Dammann R., Pfeifer G. P., Avruch J. (2002). The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Onkogene* 21. 1381-1390.
- [ Ove53 ] Overhauser A. (1953). *Phys. Rev.* 89. 689; 92. 411.
- [ Pac00 ] Pacold M.E., Suire S., Perisic O., Lara-Gonzales S., Davis C.T., Walker E.H., Hawkins P.T., Stephens L., Eccleston J.F., Williams R.L. (2000). Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* 103. 931-943
- [ Pai89 ] Pai E.F., Kabsch W., Krengel U., Holmes K.C., John J., Wittinghofer A. (1989). Structure of the Guanine-Nucleotide-Binding Domain of the Ha-Ras Onkogene Product P21 in the Triphosphate Conformation. *Nature* 341. 209-214.
- [ Per00 ] Riek R., Pervushin K., Wüthrich K. (2000). TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution. *Trends Biochem. Sci.* 25. 462-468.
- [ Poi96 ] Poirel H., Rack K., Delabesse E., Radford-Weiss I., Troussard X., Debert C., Leboef D., Bastard C., Picard F., Veil-Buzyn A., Flandrin G., Bernard O., Macintyre E. (1996). Incidence and characterization of MLL gene (11q23) rearrangements in acute myeloid leukemia M1 and M5. *Blood* 87. 2496-2505.
- [ Pon95 ] Ponting C.P. (1995). SAM: a novel motif in yeast sterile and *Drosophila* polyhomeotic proteins. *Protein Sci.* 4. 1928-1930.
- [ Pra93 ] Prasad R., Gu Y., Alder H., Nakamura T., Canaani O., Saito H., Huebner K., Gale R.P., Nowell P.C., Kuriyama K., Miyazaki Y., Croce C.M., Canaani E. (1993). Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer. Res.* 53. 5624-5628.
- [ Rad03 ] Radziwill G., Erdmann R.A., Margelisch U., Moelling K. (2003). The Bcr kinase downregulates ras signaling by phosphorylating AF-6 and binding to its PDZ domain. *Mol. Cell. Biol.* 23. 4663– 4672.
- [ RCBS ] <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>
- [ Rud01 ] Rudolph M.G., Linnemann T., Grünwald P., Wittinghofer A., Vetter I.R., Herrmann C. (2001). Thermodynamics of Ras/effector interactions probed by isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Chem.* 276. 23914-23921.
- [ Sal98 ] Salzmann M., Pervushin K., Wider G., Senn H., Wüthrich K. (1998). TROSY in triple-resonance experiments: New perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95. 13585-13590.
- [ Sal99 ] Salzmann M., Wider G., Pervushin K., Wüthrich K. (1999). Improved sensitivity and coherence selection for [15N,1H]-TROSY elements in triple resonance experiments. *J. Biomol NMR*. 15. 181-184.
- [ Sand99 ] Sander E.E., Collard J.G. (1999). Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur. J. Cancer* 35. 1905-1911.

- 
- [ Sche01 ] Scheffzek K., Grünewald P., Wohlgemuth S., Kabsch W., Tu H., Wigler M., Wittinghofer A., Herrmann C. (2001). The Ras-Byr2RBD Complex: Structural Basis for Ras Effector Recognition in Yeast. *Structure* 9. 1043-1050.
- [ Schi98 ] Schimmoller F., Simon I., Pfeffer S.R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* 273. 22161-22164.
- [ Schu95 ] Schurmann A., Brauers A., Massmann S., Becker W., Joost H.G. (1995). Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1). *J. Biol. Chem.* 270. 28982-28988.
- [ Shao98 ] Shao H., Kadono-Okuda K., Finlin B.S., Andres D.A. (1999). Biochemical characterization of the Ras-related GTPases Rit and Rin. *Arch. Biochem. Biophys.* 371. 207-219.
- [ Stei01 ] Steiner G. (2001). Dissertation. Universität Regensburg.
- [ Stie06 ] Stieglitz B., Schwarz D., Yldiz Ö., Herrmann C. (2006). Structural and functional insights into complex formation of NORE1A and Ras. (in Vorbereitung: Ruhr-Universität-Bochum)
- [ Su03 ] Su L., Hattori M., Moriyama M., Murata N., Harazaki M., Kaibuchi K., Minato N. (2003). AF-6 controls integrin-mediated cell adhesion by regulating Rap1 activation through the specific recruitment of Rap1GTP and SPA-1. *J. Biol. Chem.* 278. 15232–15238.
- [ Tach00 ] Tachibana K., Nakanishi H., Mandai K., Ozaki K., Ikeda W., Yamamoto Y., Nagafuchi A., Tsukita S., Takai, Y. (2000). Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J. Cell Biol.* 150, 1161–1171.
- [ Tak96 ] Takahisa M, Togashi S, Suzuki T, Kobayashi M, Murayama A, Kondo K, Miyake T, Ueda R. (1996). The *Drosophila* tamou gene, a component of the activating pathway of extramacrochaetae expression, encodes a protein homologous to mammalian cell-cell junction-associated protein ZO-1. *Genes Dev.* 15. 1783-95.
- [ Tak99 ] Takahashi K., Nakanishi H., Miyahara M., Mandai M., Satoh K., Satoh A., Nishioka H., Aoki J., Nomoto A., Mizoguchi A., Takai Y. (1999). Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junction through interaction with afadin, a PDZ domain-containing protein. *J. Cell Biol.* 145, 539-549
- [ Tan93 ] Tanaka K., Davey J., Imai Y., Yamamoto M. (1993). *Schizosaccharomyces pombe* map3 encodes the putative M-factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 13. 80-88.
- [ Tu97 ] Tu H., Barr M.M., Dong D., Wilger M. (1997). Multiple regulatory domains of the Byr2 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 17. 5876-5887.
- [ Vav98 ] Vavvas D, Li X., Avruch J., Zhang X.F. (1998). Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J. Biol. Chem.* 273. 5439-5442.
- [ Voj98 ] Vojtek A.B., Der C.J. (1998). Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 273. 19925-19928.
- [ Vos00 ] Vos M.D., Ellis C.A., Bell A., Birrer M.J., Clark G.J. (2000). Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 35669-35672.
- [ Wei99 ] Weiss B., Bollag G., Shannon K. (1999). Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1. *Am. J. Med. Genet.* 89. 14-22.
-

- [ Wes96 ] Wes P.D., Yu M., Montell C. (1996). RIC, a calmodulin-binding Ras-like GTPase. *EMBO J.* 15. 5839-5848.
- [ Witt00 ] Wittinghofer A., Waldmann H. (2000). Ras – ein molekularer Schalter bei der Tumorentstehung. *Angewandte Chemie* 112. 4360-4383.
- [ Xia02 ] Xia B., Tsui V., Case D.A., Dyson H.J., Wright P.E. (2002). Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water. *J. Biomol. NMR* 22. 317-331.
- [ Yee97 ] Yee W.M., Worley P.F. (1997). Rheb interacts with Raf-1 kinase and may function to integrate growth factor- and protein kinase A-dependent signals. *Molecular & Cellular Biology* 17. 921-933.
- [ Yok01 ] Yokoyama S., Tachibana K., Nakanishi H., Yamamoto Y., Irie K., Mandai K., Nagafuchi A., Monden M., Takai Y. (2001).  $\alpha$ -Catenin-independent Recruitment of ZO-1 to Nectin-based Cell-Cell Adhesion Sites through Afadin. *Mol. Biol. Cell* 12. 1595-1609.
- [ Yon95 ] Yonemura S., Itoh M., Nagafuchi A., Tsukita S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similar and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* 108. 127– 142.

---

# Verzeichnis der Abkürzungen

<b>ALL</b>	Akute lymphoblastische Leukämie
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>B<sub>0</sub></b>	statisches magnetisches Hauptfeld
<b>CNS</b>	Crystallography & NMR System
<b>C-Terminus</b>	Carboxyende einer Polypeptidkette
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>DPTI</b>	Dithioerythritol
<b>DSS</b>	4,4-Dimethyl-4-Silapentan-Sulfonsäure
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat
<b>GAP</b>	GTPase-aktivierendes Protein
<b>GDS</b>	Guanosine nucleotide dissociation stimulator
<b>GEF</b>	Guanosine nucleotide exchange factor
<b>Gpp(NH)p</b>	Guanosine –5´-(beta, gamma-imido)triphosphat
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>GTP</b>	Guanosin-5´-triphosphat
<b>GTPase</b>	Enzym, welches die Hydrolyse von proteingebundenem GTP zu proteingebundenem GDP beschleunigt
<b>HF-Puls</b>	Hochfrequenz-Puls
<b>H-Ras</b>	Ras aus Homo sapiens
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<b>Hz</b>	Hertz
<b>K<sub>D</sub></b>	Dissoziationskonstante
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kcal</b>	Kilokalorie
<b>kJ</b>	Kilojoule
<b>MHz</b>	10 <sup>6</sup> Hertz
<b>Mr</b>	relatives Molekulargewicht
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance
<b>NOE</b>	Nuclear Overhauser Effect
<b>N-Terminus</b>	Aminoende einer Polypeptidkette
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>ppm</b>	parts per million
<b>R</b>	Rhombizität
<b>R<sub>1</sub></b>	longitudinale Relaxationsrate
<b>R<sub>2</sub></b>	transversale Relaxationsrate

---

<b>RAPL</b>	Spleißvariante von NORE1A
<b>RFAC</b>	R-Factor
<b>SDS-Page</b>	Sodiumdodecylsulfat Polyamidgelelektrophoresis
<b>T<sub>1</sub></b>	longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit
<b>T<sub>2</sub></b>	transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit
<b>TALOS</b>	Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity
<b>TOCSY</b>	Total Correlation Spectroscopy
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>ZO1</b>	Zonula Occludens 1



## 10. Anhang

(1) Tabelle der Intensitäten <sup>5</sup> und der Änderungen der chemischen Verschiebungen aus den Titrationsmessungen von AF6 (ungebunden) und AF6 (mit H-Ras)

AS-Nr.	AF6 (frei)	AF6 (H-Ras)	Quotient	$\Delta$	AS-Typ
3	21735,00	50679,00	0,43	13,60	A
4	64183,00	133937,00	0,48	3,69	G
5	146282,00	344749,00	0,42	0,82	G
6	79575,00	123812,00	0,64	0,82	R
7	403688,00	695960,00	0,58	9,60	D
8	557948,00	1011428,00	0,55	1,61	E
9	632018,00	1232358,00	0,51	9,60	E
10	604917,00	842227,00	0,72	1,60	R
11	628880,00	992019,00	0,63	0,80	R
13	555089,00	840244,00	0,66	0,80	L
14	441940,00	741474,00	0,60	9,60	A
15	698242,00	1149544,00	0,61	9,60	D
16	465331,00	679078,00	0,69	0,80	I
17	313344,00	440127,00	0,71	12,45	I
18	499866,00	730960,00	0,68	9,78	H
19	363464,00	620697,00	0,59	3,26	H
20	200605,00	322914,00	0,62	10,11	W
21	94468,00	181570,00	0,52	0,80	N
24	71960,00	252266,00	0,29	16,40	R
25	131028,00	267575,00	0,49	16,40	L
26	123077,00	184194,00	0,67	13,61	D
31	124668,00	228741,00	0,55	20,29	S
32	446223,00	751110,00	0,59	12,00	Q
34	328034,00	569220,00	0,58	11,63	T
35	87351,00	140736,00	0,62	9,60	E
36	402769,00	650392,00	0,62	3,54	D
37	414556,00	694645,00	0,60	10,16	L
38	486282,00	816483,00	0,60	3,50	E
39	386084,00	583099,00	0,66	12,41	F
40	309027,00	445694,00	0,69	15,45	H
41	359182,00	477372,00	0,75	33,75	G

<sup>5</sup> Quotient =  $\text{Int}(\text{AF6}_{\text{frei}})/\text{Int}(\text{AF6}_{\text{H-Ras}})$ ;  $\Delta$  = Verschiebungsänderung in Hz

42	228296,00	209783,00	1,09	25,99	V
43	33692,00	74485,00	0,45	0,00	M
44	126110,00	51283,00	2,46	0,00	R
45	204290,00	47402,00	4,31	0,00	F
46	170070,00	41044,00	4,14	0,00	Y
47	227156,00	43483,00	5,22	0,00	F
48	187028,00	36803,00	5,08	0,00	Q
49	355892,00	42580,00	8,36	0,00	D
50	218728,00	142602,00	1,53	33,75	K
51	371754,00	435286,00	0,85	35,91	A
53	283476,00	240219,00	1,18	73,80	G
55	171808,00	101584,00	1,69	28,59	F
56	214443,00	45361,00	4,73	0,00	A
57	273866,00	43350,00	6,32	0,00	T
58	270823,00	32442,00	8,35	0,00	K
59	146931,00	350189,00	0,42	21,63	C
60	306212,00	54966,00	5,57	0,00	I
61	250371,00	71483,00	3,50	0,00	R
62	211972,00	45525,00	4,66	0,00	V
63	366155,00	561880,00	0,65	22,65	S
64	263253,00		0,00	17,79	S
65	499629,00	721959,00	0,69	6,62	T
66	592960,00	938587,00	0,63	3,54	A
67	205769,00	305666,00	0,67	22,63	T
68	265499,00	297101,00	0,89	13,16	T
70	361006,00	578958,00	0,62	17,67	D
71	466808,00	511040,00	0,91	31,21	V
72	345847,00		0,00	0,00	I
74	453734,00	519112,00	0,87	24,07	T
75	284103,00	92367,00	3,08	0,00	L
76	476208,00	125926,00	3,78	0,00	A
77	497589,00	58429,00	8,52	0,00	E
78	371818,00	50587,00	7,35	0,00	K
79	255734,00	34603,00	7,39	0,00	F
80	291906,00	191217,00	1,53	24,47	R
82	199315,00	61825,00	3,22	0,00	D
84	252287,00	150594,00	1,68	31,71	R
85	175982,00	59813,00	2,94	0,00	M
86	82092,00	154125,00	0,53	12,99	L
87	79691,00	215474,00	0,37	21,00	S

90	489433,00	1003849,00	0,49	9,92	K
91	400671,00	692019,00	0,58	23,93	Y
92	257285,00	300596,00	0,86	52,91	S
93	221250,00	232882,00	0,95	85,68	L
94	187708,00	169538,00	1,11	23,37	Y
95	153322,00	214684,00	0,71	35,17	E
96	167303,00	227706,00	0,73	32,66	V
97	160451,00	308364,00	0,52	22,76	H
99	385450,00	645174,00	0,60	20,00	S
100	689451,00	1535981,00	0,45	10,11	G
101	457843,00	906825,00	0,50	10,16	E
102	324046,00		0,00	0,00	R
103	289770,00	507416,00	0,57	0,82	R
104	224336,00	281759,00	0,80	10,19	L
105	225490,00	339107,00	0,66	11,54	D
106	335111,00	369633,00	0,91	21,63	I
107	72091,00	231373,00	0,31	6,46	D
108	388067,00	601467,00	0,65	10,16	E
109	276401,00	233190,00	1,19	19,52	K
111	200324,00	325197,00	0,62	10,16	L
112	287842,00	294070,00	0,98	11,54	V
113	327598,00	484892,00	0,68	12,45	V
114	318966,00	523689,00	0,61	10,16	Q
117	182536,00	398829,00	0,46	20,25	W
124	27648,00	72338,00	0,38	0,00	G
125	163436,00	277633,00	0,59	23,93	R
126	149383,00	52981,00	2,82	0,00	F
127	237896,00	293601,00	0,81	10,16	V
128	221140,00	177591,00	1,25	0,00	L
129	220160,00	36407,00	6,05	0,00	K
130	266606,00	372481,00	0,72	10,08	N
131	257227,00	448896,00	0,57	11,54	E
132	148809,00	207644,00	0,72	13,73	N
133	302175,00	501286,00	0,60	24,49	D
134	711846,00	1534733,00	0,46	12,00	A
135	1235212,00	4019285,00	0,31	3,26	I
137	680612,00	1896376,00	0,36	1,60	A
138	301203,00	763787,00	0,39	0,80	K
139	128331,00	231170,00	0,56	1,60	K
140	137195,00	286337,00	0,48	0,80	A

---

141	2205934,00	7563026,00	0,29	0,80	Q
-----	------------	------------	------	------	---

(2) Tabelle der Intensitäten <sup>6</sup> und der Änderungen der chemischen Verschiebungen aus den Titrationsmessungen von AF6 (ungebunden) und AF6 (mit Rap1A)

AS-Nr.	AF6 (frei)	AF6 (Rap1A)	Quotient	$\Delta$	AS-Typ
3	21735	187725	0,115781063	12,2584069	A
4	64183	440151	0,145820412	0	G
5	146282	723004	0,202325298	0,80013	G
6	79575	323088	0,246295127	0,80013	R
7	403688	814624	0,495551322	0,80013	D
8	557948	957206	0,582892293	3,32428	E
9	632018	722711	0,874510005	11,66186596	E
10	604917	476176	1,270364319	6,4864	R
11	628880	511318	1,229919541	3,340442225	R
13	555089	293787	1,889426693	26	L
14	441940	283712	1,557706406	3,2432	A
15	698242	633591	1,102039013	11,66186596	D
16	465331	253544	1,835306692	3,340442225	I
17	313344	253747	1,234867801	10,89557255	I
18	499866	235590	2,121762384	31,34017624	H
19	363464	194625	1,867509313	14,29841239	H
20	200605	93604	2,143124225	11,6846741	W
21	94468	45162	2,091758558	11,6846741	N
24	71960	55534	1,295782764	21,05466613	R
25	131028	76640	1,709655532	119,1852652	L
26	123077	243904	0,50461247	14,29841239	D
31	124668	48340	2,578982209	21,84559431	S
32	446223	211786	2,106952301	44,37057699	Q
34	328034	139387	2,35340455	11,66186596	T
35	87351	95890	0,910950047	6,535563708	E
36	402769	395872	1,017422298	6,4864	D
37	414556	352610	1,175678512	12,94427118	L
38	486282	260435	1,86719143	42,9000898	E
39	386084	308316	1,25223472	3,340442225	F
40	309027	244105	1,265959321	17,20129514	H
41	359182	212268	1,692115627	43,20702	G
42	228296	78181	2,920095675	91,23657262	V
43	33692	20736	1,624807099	0,80013	M

<sup>6</sup> Quotient =  $\text{Int}(\text{AF6}_{\text{frei}})/\text{Int}(\text{AF6}_{\text{Rap1A}})$ ;  $\Delta$  = Verschiebungsänderung in Hz

44	126110	65068	1,938126268	22,96618679	R
45	204290	59188	3,451544232	11,66186596	F
46	170070	70190	2,422994729	11,66186596	Y
47	227156	79600	2,853718593	0	F
48	187028	57642	3,244648	11,6846741	Q
49	355892	104936	3,391514828	11,20182	D
50	218728	122856	1,780360748	0,80013	K
51	371754	210252	1,76813538	0,80013	A
53	283476	137316	2,064406187	70,23908876	G
54		181273	0	0	N
55	171808	79752	2,154278263	0	F
56	214443	62009	3,45825606	3,340442225	A
57	273866	91072	3,00713721	0	T
58	270823	90930	2,978367975	3,419217094	K
59	146931	65916	2,229064264	11,20182	C
60	306212	99516	3,077012742	86,81694462	I
61	250371	93294	2,683677407	48,8167177	R
62	211972	81516	2,600372933	3,2432	V
63	366155	216804	1,688875667	21,05466613	S
64	263253	247898	1,061940798	13,05388	S
65	499629	565528	0,883473497	11,20182	T
66	592960	396000	1,497373737	10,40169	A
67	205769	126415	1,62772614	10,89557255	T
68	265499	198247	1,339233381	11,20182	T
70	361006	339874	1,062175983	12,2584069	D
71	466808	272252	1,71461734	3,340442225	V
72	345847	151339	2,285247028	0,80013	I
74	453734	338796	1,339254301	0	T
75	284103	94860	2,994971537	0	L
76	476208	181880	2,618253794	3,340442225	A
77	497589	166190	2,994097118	0	E
78	371818	101559	3,661103398	0,80013	K
79	255734	75070	3,406607167	3,2432	F
80	291906	85746	3,404310405	11,66186596	R
82	199315	63604	3,133686561	120,5910584	D
84	252287	159222	1,584498373	0	R
85	175982	139432	1,262134948	41,87574176	M
86	82092	203820	0,402767147	6,4864	L
87	79691	334058	0,238554383	12,94427118	S
90	489433	520718	0,939919496	12,30150188	K

91	400671	221110	1,812089005	64,81053	Y
92	257285	131824	1,951731096	65,69482128	S
93	221250	102080	2,167417712	97,61586	L
94	187708	87784	2,138293994	53,69740439	Y
95	153322	78002	1,965616266	6,56748	E
96	167303	76264	2,193734921	11,66186595	V
97	160451	98232	1,633388305	22,13634336	H
99	385450	464927	0,829054884	11,20182	S
100	689451	1051776	0,65551125	0	G
101	457843	378524	1,20954814	13,07837876	E
102	324046	250825	1,291920662	11,20182	R
103	289770	238622	1,214347378	10,89557255	R
104	224336	176744	1,26927081	11,66186596	L
105	225490	268536	0,839701195	3,340442225	D
106	335111	334672	1,001311732	6,535563708	I
107	72091	93698	0,769397426	3,340442225	D
108	388067	459870	0,843862396	11,20182	E
109	276401	281407	0,982210819	0	K
111	200324	145889	1,373126144	11,20182	L
112	287842	131696	2,185654841	0	V
113	327598	414582	0,790188672	0	V
114	318966	192094	1,660468312	3,2432	Q
117	182536	77928	2,342367313	11,6846741	W
124	27648	27193	1,016732247	23,32373191	G
125	163436	82684	1,976633932	6,56748	R
126	149383	65864	2,26805235	11,66186596	F
127	237896	164508	1,446105964	11,66186596	V
128	221140	90704	2,438040219	0,80013	L
129	220160	88944	2,475265335	3,2432	K
130	266606	297996	0,894663016	11,66186596	N
131	257227	160865	1,599024026	35,27723368	E
132	148809	251346	0,592048411	9,7296	N
133	302175	403903	0,748137548	21,81541686	D
134	711846	660764	1,07730748	32,16910277	A
135	1235212	3225596	0,382940703	3,340442225	I
137	680612	2506301	0,271560359	0	A
138	301203	1393220	0,216191987	0,80013	K
139	128331	768248	0,167043715	3,2432	K
140	137195	855042	0,160454106	3,340442225	A
141	2205934	6583538	0,335068165	0,80013	Q



**(3) ITC-Messung der Bindung von AF6-RA1 (AF6-RBD) und Mutanten an Ras•GppNHp**  
(Prof. Dr. C. Herrmann, Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum)

Die Messungen erfolgten bei 25°C in 50mM Tris (pH7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>. <sup>a</sup>K<sub>d</sub> = 1/K<sub>a</sub>, <sup>b</sup>ΔG° = - RTlnK<sub>a</sub>, <sup>c</sup>ΔG° = ΔH°-TΔS°

**AF6-RBD•RasGppNHp**

AF6_RA1	n	K <sub>d</sub> <sup>a</sup> (μM)	ΔH° (kcal/mol)	ΔG° <sup>b</sup> (kcal/mol)	TΔS° <sup>c</sup> (kcal/mol)
wt	0.85	2.2	-5.8	-7.7	1.9
L13A	0.81	3.7	-9.0	-7.4	1.6
R24A	0.91	1.4	-5.6	-8.0	2.4
D26A	0.83	1.2	-7.1	-8.1	1.0
S31A	0.72	2.0	-8.0	-7.8	-0.2
R44A	1.10	99.0	-3.1	-5.5	2.4
K58A	0.82	15.5	-7.5	-6.6	-1.9
E77K	0.72	0.1	-8.5	-9.4	0.9
K78A	0.72	16.3	-4.9	-6.5	1.6
(30-141)	1.14	7.0	-6.3	-7.0	0.7
(38-141)	0.34	14.1	-9.3	-6.6	-2.7

**(4) ITC-Messung der Bindung von AF6-RA1 (AF6-RBD) und Mutanten an Rap1B•GppNHp** (Prof. Dr. C. Herrmann, Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum)

Die Messungen erfolgten bei 25°C in 50mM Tris (pH7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>. <sup>a</sup>K<sub>d</sub> = 1/K<sub>a</sub>, <sup>b</sup>ΔG° = -RTlnK<sub>a</sub>, <sup>c</sup>ΔG° = ΔH°-TΔS°

**AF6-RBD•Rap1B`GppNHp**

AF6_RA1	n	K <sub>d</sub> <sup>a</sup> (μM)	ΔH° (kcal/mol)	ΔG° <sup>b</sup> (kcal/mol)	TΔS° <sup>c</sup> (kcal/mol)
wt	0.84	0.3	-0.8	-8.8	8.0
L13A	0.70	0.3	-6.9	-9.0	2.1
R24A	0.76	0.1	-6.8	-9.4	2.6
D26A	0.65	0.4	-2.6	-8.7	6.1
S31A	0.67	0.3	-3.3	-9.0	5.7
R44A	0.86	4.2	1.8	7.3	9.1
K58A	0.72	5.2	-0.8	-7.2	6.4
E77K	0.66	0.1	-2.0	-9.5	7.5
K78A	0.76	1.4	-1.3	-8.0	6.7
(30-141)	0.90	4.8	-5.3	-7.3	2.0
(38-141)	0.36	15.2	-7.7	-6.6	-1.1

**(5) Überblick der Aminosäurereste bekannter Ras-Bindedomänen und ihrer Wechselwirkungen mit Aminosäuren von H-Ras (Literatur: Nas95, Sche01 und Goh03)**

	RBD-Residuen	Ras-Interaktionspartner
AF6 (1-141)	Arg 44	
RalGEF (1-97)	Arg 16	Glu 37
Byr2 (71-180)	Arg 74	Glu 37
C-Raf1 (51-131)	Arg 59	Glu 37
AF6 (1-141)	Asn 54	
RalGEF (1-97)		
Byr2 (71-180)	Gln 81	Arg 41
C-Raf1 (51-131)	Asn 64	Arg 41
AF6 (1-141)	Ala 56	
RalGEF (1-97)		
Byr2 (71-180)	Ala 84	Asp 38
C-Raf1 (51-131)	Arg 67	Ser 39
AF6 (1-141)	Thr 57	
RalGEF (1-97)	Tyr 27	Ser 39
Byr2 (71-180)	Val 85	
C-Raf1 (51-131)	Thr 68	Asp 38
AF6 (1-141)	Lys 58	
RalGEF (1-97)	Lys 28	Tyr 40
Byr2 (71-180)	Gln 86	
C-Raf1 (51-131)	Val 69	Glu 37
AF6 (1-141)	Lys 78	
RalGEF (1-97)	Lys 48	Asp 33, Pro 34
Byr2 (71-180)	Lys 101	Asp 38
C-Raf1 (51-131)		
AF6 (1-141)	Arg 84	
RalGEF (1-97)		
Byr2 (71-180)		
C-Raf1 (51-131)	Arg 89	Asp 38

Die in dieser Ansicht aufgelisteten Aminosäuren von AF6-RBD werden in der vorliegenden Arbeit als komplementär zu den darunter gelisteten Residuen der anderen RBDs vermutet.

**(6) Sequentielles Alignment der gelisteten Ras-Bindedomänen unter Berücksichtigung der Anordnung ihrer Sekundärstrukturelemente in der Tertiärstruktur**

	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
AF6	D	L	F	E	I	S	Q	P	T	E	D	L	E	F	H	G	V	M	R	F	Y	F	Q	D	K
RalGEF													C			C	I	I	R	V	S	L	D	V	D
Byr2																C	I	L	R	F			I	A	
c-Raf1															S	N	T	I	R		V	F	L		

	51	52	53	54		55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
AF6	A	A	G	N		F	A	T	K	C	I	R	V	S	S	T	A	T	T	Q	D	V	I	E	T
RalGEF	N		G	N	M			Y	K	S	I	L	V	T	S	Q	D	K	A	P	A	V	I	R	K
Byr2	C	N	G	Q	T	R	A	V	Q	S		R	G	D	Y	Q	K	T	L	A	I	A	L		K
c-Raf1	P			N	K	Q	R	T	V		V	N	V	R	N	G	M	S	L	H	D	C	L	M	K

	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88				89		90	91	92	93	94	
AF6	L	A	E	K	F	R	P	D	M	R	M	L	S	S				P		K	Y	S	L	Y	
RalGEF	A	M	D	K		H				N		L	D		E	D	E	P	E	D	Y	E	L	L	
Byr2				K	F							S	L	E	D	A	S		K	F	I	V		C	
c-Raf1		A			L				V	R	G	L					Q	P	E	C	C	A	V	F	

	95	96	97	98	99	100	101	102		103	104	105	106	107	108	109			110	111	112	113	114	115	116
AF6	E	V	H	V	S	G	E	R		R	L	D	I	D	E	K			P	L	V	V	Q	L	N
RalGEF	Q	I		L	S	D	D	R		K	L	K	I	P	E	N	A	N				V	F		
Byr2		V	S	Q	S	S		R	I	K	L		I	T	E	E	E	F	K	Q	I	C	F		
c-Raf1	R	L	L	H	E	H	K	G	K	K	A	R	L	D	W	N			T	D	A	A	S		

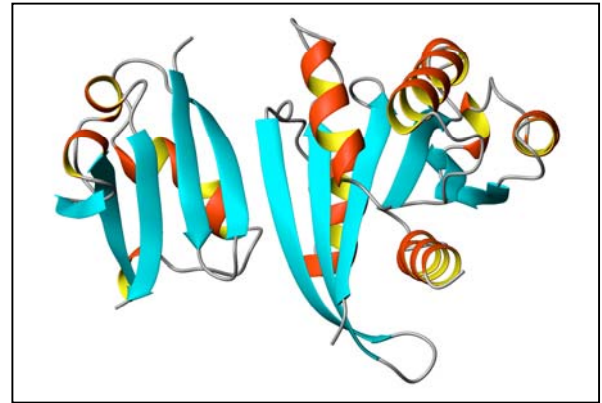
  

	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134		135				136	
AF6	W	N	K	D	D	R	E	G	R	F	V	L	K	N	E	N	D	A		I				P	
RalGEF	Y								A	M	N	S	A	N		Y	D	F		I	L	K	K	R	
Byr2		N	S	S	S		S	P	E	P					E	R	D	R	L	I	I	V	P	K	E
c-Raf1	L	I	G	E			E		L	Q	V	D	F						L						

			137	138	139	140	141																		
AF6			A	K	K	A	Q																		
RalGEF																									
Byr2	K	P	C	P	S	F	E	D	L	R	R	S	W	E	I	E			0						
c-Raf1																									

Die n-terminale  $\alpha$ -Helix A1 von AF6-RBD wurde bei diesem Alignment nicht berücksichtigt, da RalGEF, Byr2-RBD und die C-Raf1-Kinase keine n-terminale  $\alpha$ -Helix in ihrer Tertiärstruktur aufweisen. Das Alignment bezieht sich auf den strukturellen Kernbereich der RBDs (Ubiquitin-Faltungsmotiv). Das Alignment soll sequentielle Gemeinsamkeiten für die RBD von AF6 verdeutlichen, deshalb bezieht sich die Nummerierung der Aminosäurereste lediglich auf diese Domäne.  $\alpha$ -Helices sind in der Sequenz von AF6-RBD blau,  $\beta$ -Faltblätter grün gefärbt. Identische Aminosäuren in der sequentiellen Überlagerung sind in Orangerot hervorgehoben.

**(7) Röntgenstrukturkomplexe von H-Ras und Rap1A zum Vergleich****Byr2•H-Ras (PDB-ID: 1K8R) [Sche01]****C-Raf1•Rap1A (PDB-ID: 1C1Y) [Nas95]**

Zum schnellen visuellen Vergleich der in der vorliegenden Arbeit gerechneten AF6•H-Ras- und AF6•Rap1A-Komplexe mit anderen RBDs sollen an dieser Stelle zwei der bekannten Röntgenkristallstrukturen von H-Ras und Rap1A-Komplexen mit ihren RBDs gezeigt werden.

## (8) Zuordnung der Resonanzen von Nore1-RBD

Chemische Verschiebungen von Nore1-RBD [ppm]								
Gln 5	H	8,87						
	N	124,37	CA	56,55	C	176,32	CB	28,06
Asp 12	H	8,01						
	N	112,42	CA	55,55	C	172,55	CB	
Ser 13	H	8,96						
	N	120,57	CA	60,63	C	176,50	CB	66,76
Leu 22	H	7,70						
	N	116,71	CA	53,18	C	176,46	CB	39,92
Gly 23	H	7,97						
	N	109,33	CA	45,52	C	177,20	CB	
Asp 29	H	8,16						
	N	121,82	CA	53,70	C		CB	41,2
Gly 30	H	7,71						
	N	109,36	CA	45,05	C		CB	
Thr 31	H	7,82						
	N	113,05	CA	61,92	C	174,07	CB	70,50
Tyr 32	H	7,59						
	N	115,42	CA	53,94	C	181,55	CB	70,36
Thr 33	H	8,53						
	N	108,50	CA	58,65	C	173,78	CB	
Gly 34	H	8,11						
	N	106,86	CA	58,70	C	173,73	CB	
Phe 35	H	9,29						
	N	119,65	CA	56,78	C		CB	
Thr 47	H	8,39						
	N	114,66	CA	61,50	C	177,11	CB	
Val 48	H	8,53						
	N	126,56	CA	62,64	C	177,65	CB	
Ile 61	H	7,99						
	N	113,40	CA	61,51	C	178,03	CB	37,77
Thr 70	H	7,43						
	N	122,19	CA	63,56	C	174,67	CB	
Asp 71	H	8,41						
	N	119,02	CA	53,20	C	176,74	CB	38,63

Thr 74	H	8,17						
	N	115,56	CA	61,50	C	176,71	CB	69,79
Ser 75	H	8,05						
	N	116,70	CA	61,78	C	174,79	CB	
Tyr 77	H	8,65						
	N	120,97	CA	56,24	C	174,54	CB	41,38
Leu 78	H	9,05						
	N	122,76	CA	54,41	C	176,30	CB	35,10
Lys 84	H	8,64						
	N	125,89	CA	55,64	C	174,59	CB	35,20
Gln 85	H	7,51						
	N	123,72	CA	54,40	C	174,99	CB	
Thr 92	H	8,04						
	N	122,12	CA	67,21	C		CB	
Thr 93	H	8,15						
	N	112,52	CA	61,92	C	177,66	CB	
Val 97	H	8,79						
	N	124,98	CA	65,57	C	180,19	CB	
Gln 99	H	8,55						
	N	119,12	CA	59,58	C	177,35	CB	
Gly 100	H	7,87						
	N	106,79	CA	44,66	C	179,92	CB	
Val 107	H	8,09						
	N	121,55	CA	63,31	C		CB	
Val 108	H	8,51						
	N	120,34	CA	60,33	C	174,60	CB	
Phe 114	H	8,43						
	N	123,39	CA	56,74	C	175,55	CB	
Ala 115	H	9,07						
	N	121,24	CA	51,04	C		CB	23,20
Leu 116	H	7,16						
	N	119,04	CA	54,21	C	176,96	CB	42,43
Phe 117	H	9,11						
	N	130,57	CA	58,14	C	174,39	CB	
Ile 120	H	8,45						
	N	119,92	CA	54,93	C	178,03	CB	
His 121	H	9,03						
	N	117,77	CA	54,55	C	177,83	CB	



Asp 123	H	9,38						
	N	128,10	CA	55,49	C	175,49	CB	39,60
Gly 124	H	8,59						
	N	105,26	CA	45,37	C	175,82	CB	
Ala 144	H	8,20						
	N	120,58	CA	52,71	C		CB	19,00
Gly 145	H	8,39						
	N	109,05	CA	45,26	C	178,69	CB	

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mitte Januar 2002 bis November 2006 im Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr.Dr.H.R. Kalbitzer angefertigt. Viele Kollegen waren am Entstehen dieser Arbeit direkt und indirekt beteiligt. Ihnen sei an dieser Stelle gedankt.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr.Dr.H.R. Kalbitzer bedanken, der mit seiner freundlichen und umgänglichen Art stets Interesse an meiner Arbeit zeigte, und mit interessanten Anregungen und Vorschlägen viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt gleichermaßen PD Dr. Werner Kremer und PD Dr. Wolfram Gronwald, die mich beide mit großem Sachverstand betreuten, alle Fragen und Probleme gewissenhaft untersuchten und trotz mangelnder Zeit immer ein offenes Ohr für alle Anliegen hatten.

Weiterhin möchte ich mich bei allen, auch namentlich nicht genannten Lehrstuhlangehörigen für ihre Kollegialität und Freundschaft bedanken, die das Arbeiten hier wahrhaft angenehm machte.

Dabei seien besonders meine ehemaligen "Mitinsassen" Barbara Domogalla, Renate Kirchhöfer und Fritz Huber genannt, die immer gut für ein Gespräch, eine Tasse starken Kaffee oder einen kleinen Scherz waren.

Für die gute Zusammenarbeit bei funktionstechnischen Fragen, und bei Problembewältigungsstrategien im Zusammenhang mit AUREMOL und den schönen Seiten des Lebens, die wir miteinander teilen möchte ich Jochen Trenner und Konrad Brunner danken. Ebenfalls möchte ich mich auch bei Alexander Fink und Thorsten Graf bedanken, die ich als Menschen und Kollegen sehr zu schätzen weiß. Ihr seid alle vier wunderbare Menschen. Bleibt so, wie ihr seid!

Weiteren Dank gilt Peter Geyer und Norman Kachel, Michael Spörner und Christina Schreier für ihre hervorragende Kollegialität und die angenehme Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Eike Brunner für seine immerwährende Freundlichkeit und sein breites Allgemeinwissen, mit dem er unser Institut stets zu bereichern pflegt.

Herrn PD Dr. Rachel danke ich dafür, dass er sich als Zweitgutachter meiner Arbeit zur Verfügung gestellt hat und damit sein reges Interesse an der Biophysik zum Ausdruck bringt.

Für die Bereitstellung der einfach und doppelt markierten Proteinproben von Nore1-RBD möchte ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Christian Herrmann und seinen Mitarbeitern Benjamin Stieglitz und Christine Bee vom Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum bedanken.

Meiner geliebten Frau Aia und meinen beiden Buben Vincent und Leon möchte ich dafür danken, dass sie mich auch in schweren Zeiten ideell unterstützt haben und für all die Zuversicht, die ihr gezeigt habt, auch wenn uns der Wind mal wieder eiskalt ins Gesicht blies. Danke Euch Dreien! Mit Euch als Rückgrat kann man ein aufregendes, rastloses und ereignisreiches Leben bestreiten.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt, und keine Hilfsmittel, außer den angegebenen, benutzt habe.

Regensburg, November 2006

---

(Ralph-Peter Elsner)